Kritik der Methodik der Wassermannschen Reaktion und neue Vorschläge für die quantitative Messung der Komplementbindung

Von

J. KAUP

Mit 7 Abbildungen



München und Berlin 1917
Verlag von R. Oldenbourg



Kritik der Methodik der Wassermannschen Reaktion und neue Vorschläge für die quantitative Messung der Komplementbindung

Von

J. KAUP

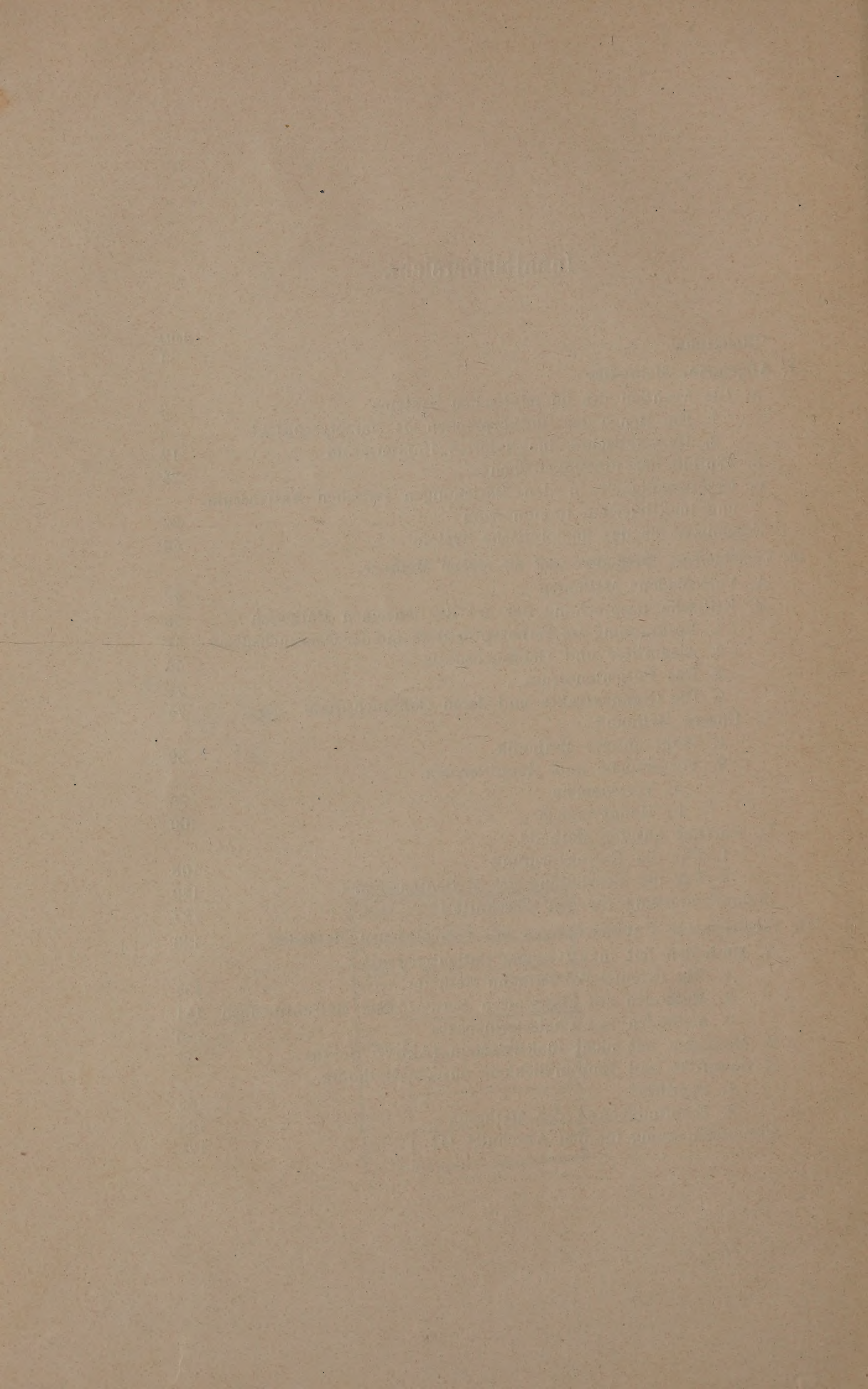
Mit 7 Abbildungen



München und Berlin 1917
Druck und Verlag von R. Oldenbourg

By

Inhaltsübersicht.



Einleitung.

Die Sicherheit und Verlässigkeit einer Methodik ist gewährleistet durch die völlige Klärung der Beziehungen der einzelnen Agentien, die für eine Methode Verwendung finden. Dies gilt für jede Methode, ganz besonders jedoch für eine Methode, wie die von Wassermann, A. Neisser und Bruck angegebene Serodiagnostik der Syphilis, die zur verbreitetsten klinisch-serologischen Methode in den letzten Jahren geworden ist.

Die Wa. R. als indirekte Methode der Komplementbindung für den Nachweis der Antikörper (Luesreagine nach Citron) hat mit 5 verschiedenen Agentien zu tun, durch deren namhafte Zahl die Technik wesentlich erschwert ist. Die geringste qualitative oder quantitative Veränderung in der Beschaffenheit des einzelnen Agens kann einen Einfluß auf das Ergebnis der Reaktion ausüben. Erleichtert wird allerdings die Methodik durch den sinnfälligen und einfachen Vorgang der Hämolyse auf Grund der Komplementwirkung. Der Vorgang der Reaktion mit ihren 2 Teilen — Zusammenwirken von Antigen (spezifischer oder unspezifischer Extrakt), Patientenserum als Antikörper und Aktivserum als Komplement (Alexin) — erfordert ebenso wie der Zusatz des

---

1) Die wesentlichen Ergebnisse wurden durch Untersuchungen im Handlaboratorium des k. und k. Armeeoberkommandos festgestellt, woselbst ich als Hygienereferent bis Weihnachten 1916 tätig war. An den Untersuchungen in Teschen war Herr J. Kretschmer, an denen in München Frau Irmgard Balser und Herr Dr. med. Hatziwassiliu beteiligt. Prof. Kaup.

hämolytischen Systems als Mischung von roten Blutzellen und entsprechenden Erythrozyten-Antiserum eine genaue quantitative Dosierung.

Nach der Ehrlichschen[1]) Auffassung besteht die Annahme, daß eine Verankerung des Alexins an das Antiserum als ein Vorgang fester chemischer Bindung zu betrachten sei und als Reaktionsprodukt sich bereits vor der Einwirkung auf die Blutzelle das Hämolysin bilde. Auch Arrhenius[2]) nimmt eine chemische Bindung von Ambozeptor und Komplement in bestimmten Mengenverhältnissen hingegen im Innern der Blutzelle als feststehende Tatsache an und bringt die Art dieser Bindung in verschiedenen Molekulargleichungen zum Ausdruck. Eine Reihe anderer Autoren, wie Morgenroth und Sachs, Scheller und andere, spricht von wechselnden Verhältnissen in den Beziehungen zwischen Ambozeptor und Komplement. Vielfach wird noch an der Fermentnatur des Komplements festgehalten, wie auch Ehrlich das Komplement für ein proteolytisches Enzym gehalten hat. Von einer Klärung der quantitativen Beziehungen im hämolytischen System kann daher noch keine Rede sein. Immer wieder wird auf die Notwendigkeit neuer Untersuchungen über die quantitativen Verhältnisse hingewiesen. In größeren Einzeldarstellungen über die Hämolyse und auch über die Serodiagnostik der Syphilis ist infolge dieser Unsicherheit den näheren Beziehungen zwischen Ambozeptor und Komplement fast ängstlich aus dem Wege gegangen. Den wenig befriedigende Stand der Ansichten über das Wesen und die Methodik der Wa. R. hat Müller[3]) treffend in die Worte zusammengefaßt: „Mit der Unkenntnis des Zustandekommens der Komplementbindung bei Lues hängt es zum großen Teil zusammen, daß wir heute weniger als je über eine einheitliche Methode verfügen und daß auch die Bewertung der Urteile keine gleichmäßige ist. Es vergeht keine Woche, die nicht neue

---

1) E. u. Morgenroth, Berl. kl. W. 1899, Nr. 1 u. 22; 1900, Nr. 21 u. 31; 1901, Nr. 10, 21 u. 22.

2) Immunochemie, Leipzig 1907.

3) Die Serodiagnose der Syphilis, Urban und Schwarzenberg, 1913.

Tatsachen über Theorie und Praxis der Reaktion bringt oder frühere Ansichten umstößt; keine wissenschaftliche Debatte findet statt, ohne daß schroffste Gegensätze aufeinander stoßen.“ Eine einheitliche Methode oder wenigstens eine genauere Klarstellung der quantitativen Beziehungen der einzelnen Komponenten der Wa. R. zueinander ist nach dem vorgeführten dringender denn je. Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß die unausgesetzten Abänderungsvorschläge ihren Grund in Fehlern oder Unsicherheiten der bisherigen Methoden haben müssen. Es sind zwar in den letzten Jahren eine Reihe von Arbeiten entstanden, die zum Teil auch auf die Technik der Reaktion Einfluß ausübten; die Unklarheiten sind jedoch noch nicht beseitigt. Die Wichtigkeit des Gegenstandes erfordert ein näheres Eingehen auf die Resultate der einzelnen Forschungen, und die mannigfachen Unklarheiten haben zugleich für eigene Versuche nach verschiedenen Richtungen Veranlassung gegeben. Diese Untersuchungen wurden zunächst in dem Handlaboratorium des k. u. k. Armee-Oberkommandos angestellt und fanden später ihre Fortsetzung im Hygienischen Institut der Universität München[1]).

I. Allgemeine Methodik.

A. Die Agentien des hämolytischen Systems.

Für das hämolytische System hat Wassermann von Anfang an Hammelblutkörperchen in Vorschlag gebracht; später wurden auch andere Blutarten benützt, wie Pferdeblutkörperchen von Detre sowie von Ballner und Decastello, Ziegenblut von Boas, Ochsenblutkörperchen von Browning, Menschenblut von Noguchi usw. Den Hammelblutkörperchen werden bestimmte Vorzüge gegeben. Es wird darauf hingewiesen, daß die Normalambozeptoren im Patientenserum ein besonderes hämo-

1) Die Fortführung dieser letzteren Untersuchungen war wesentlich erleichtert durch die munifizente Zuwendung eines größeren Betrages seitens des Herrn Generaldirektors v. Hochstetter der Holzverkohlungs-Industrie-Aktiengesellschaft in Konstanz, wofür an dieser Stelle der herzlichste Dank ausgesprochen wird.

lytisches Vermögen für Hammelblutkörperchen besitzen — weniger für Ziegenblut und gar nicht für Rinderblut — und daß sie dadurch die antikomplementäre Wirkung der Organextrakte und auch der Untersuchungssera am besten auszugleichen imstande sind. Auch jetzt noch werden, nach den guten Erfahrungen im Verlaufe der Jahre, für Hämolyseversuche fast allgemein Hammelblutkörperchen verwendet. Als hämolytisches Antiserum wird in diesem Falle das Serum von Kaninchen gewählt, welches mit Hammelblut vorbehandelt ist. Als Alexin (Komplement) wird frisches Meerschweinchenserum allgemein bevorzugt.

Für alle Hämolyseversuche muß als Medium eine isotonische Kochsalzlösung Verwendung finden, d. h. alle Verdünnungen und Ergänzungen auf ein bestimmtes Volumen dürfen nur mit physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen werden. In diesem Medium bleibt das Volumen der Blutzellen infolge gleicher Druckverhältnisse das normale, das Stroma dicht genug, um das Hämoglobin nicht austreten zu lassen. Werden gewaschene Blutkörperchen in destilliertes Wasser gebracht, so tritt bekanntlich sofort Hämolyse ein. Die Stromahülle reißt bei geändertem Druck infolge zu starker Volumzunahme; aber bereits Kochsalzlösungen von geringerer oder stärkerer Konzentration üben auf die quantitativen Beziehungen der beiden andern Reagentien des hämolytischen Systems — das Alexin (Komplement) und das Hammelblut-Antiserum — bestimmte Wirkungen aus. Besteht z. B. das Medium nur aus 0,5proz. Kochsalzlösung, so führt eine Spur von Alexin bereits bei einer normalen Menge von sensibilisierten Hbl. Hämolyse herbei; wird hingegen als Medium eine hypertonische Kochsalzlösung gewählt, z. B. eine 1,5proz. Lösung, so ist der Alexinbedarf ein wesentlich größerer als in physiologischer Kochsalzlösung. In einer Reihe von Versuchen haben wir diese Unterschiede des Komplementbedarfs in verschiedenen Kochsalzlösungen festzustellen gesucht und stets dasselbe Resultat erhalten. Im wesentlichen sind diese Wahrnehmungen eine Bestätigung der umfassenden Versuche von Kiß[1]). Die osmotischen

1) Z. f. I. Bd. 3, 1909, S. 558.

Vorgänge bei den Blutzellen sind besonders eingehend von Koeppe[1]) geschildert. Wie destilliertes Wasser schnellstens Hämolyse herbeiführt, so gibt es noch eine Reihe von Substanzen, welche allein, d. h. ohne Ambozeptor oder ohne Komplement den Austritt des Hämoglobins aus dem Stroma bewirken. Diese chemischen Substanzen wirken in den stärksten Verdünnungen, bei denen osmotische Druckunterschiede keine Rolle spielen können. Zu diesen Blutgiften gehören alle Alkalien, Äther, Alkohol, Chloroform, Sublimat, die Gallensäuren und vor allem auch die Saponinsubstanzen. Noch bedeutungsvoller als alle diese Substanzen, die eine unspezifische Hämolyse herbeizuführen vermögen, sind Stoffe, die umgekehrt eine unspezifische Hemmung der Hämolyse bewirken. Bakterien, Zellemulsionen und Organextrakte sind durchwegs Substanzen, die eine antikomplementäre, eine eigenhemmende Wirkung entfalten können. Doch äußert sich diese Wirkung — nach der Ansicht der einzelnen Autoren — nicht durch eine vermehrte Widerstandskraft der Blutkörperchen gegen die Hämolyse, sondern durch Bindung des Komplements, das für die Hämolyse in einer bestimmten Menge stets erforderlich ist.

Eine weitere Voraussetzung für jede Versuchsanordnung zum Studium des hämolytischen Systems ist die Verwendung des gleichen Volumens. Die Mengen der einzelnen Agentien müssen stets in einem bestimmten Volumen aufeinander einwirken. Wir werden später zu erörtern haben, welchen Einfluß Volumsveränderungen ausüben.

Für den Eintritt der Hämolyse ist ferner von Bedeutung die Temperatur, bei der die einzelnen Agentien aufeinander wirken. Wenn auch bei Zimmertemperatur und auch bei Kälte der Vorgang der Hämolyse sich einstellt, so wirkt doch der Aufenthalt im Blutschrank beschleunigend. Die Beurteilung eines Ergebnisses wird daher von der Temperatur und von der Zeitdauer des Aufenthaltes bei den einzelnen Temperaturen in hohem Grade abhängen.

---

1) Physikalische Chemie in der Medizin, Hölder, 1900.

Wie bereits angedeutet, tritt die spezifische Hämolyse nur ein beim Einwirken von Antiserum (Ambozeptor) und Alexin (Komplement) auf Blutkörperchen. Fehlt das Antiserum oder das Alexin oder sind deren Mengen ungenügend, so bleibt die Hämolyse aus.

Von allen diesen Agentien müssen jedoch ganz bestimmte Mengen vorhanden sein, um eine vollständige Hämolyse herbeizuführen. Diesen quantitativen Beziehungen wollen wir unsere besondere Aufmerksamkeit widmen.

1. Die Menge der Blutkörperchen als Hämolyseobjekt.

Bekanntlich kommen bei Hämolyseversuchen die Blutkörperchen, durch wiederholtes Waschen von den Serumbestandteilen befreit, als 1,0, 5,0 oder 10 proz. Aufschwemmungen in isotonischer Kochsalzlösung (0,85 Proz.) zur Anwendung. Bei einem Gesamtvolumen des für die Reaktion verwendeten Gemisches von 2,5 ccm werden gewöhnlich 0,5 ccm der z. B. 5 proz. Aufschwemmung, bei 5 ccm gewöhnlich 1,0 ccm dieser Aufschwemmungen genommen. In dem ersteren wie letzteren Falle ist der Anteil der Blutkörperchenmenge an diesem Volumen zwar der gleiche, die Aufschwemmungsdichtigkeit dieselbe, die Menge der Blutkörperchen als Hämolyseobjekt jedoch doppelt so groß. Es sind jedoch auch Komplementbindungsmethoden in Anwendung, bei denen 1 oder 10 proz. Blutkörperchen-Aufschwemmungen benützt werden. Auch kommt es auf die Herstellung der Aufschwemmung an. Das eine Laboratorium zieht bei Bereitung der Hbl.-Aufschwemmung das Volumen des defibrinierten Blutes in Berechnung, das andere das Volumen der gewaschenen Erythrozyten. Wir füllten stets auf die Marke des ungewaschenen Blutes auf.

Den Einfluß der Erythrozytenmenge auf den lytischen Effekt im hämolytischen System haben Fleckseder und Steyskal[1]) besonders hervorgehoben. Bei Reagenzglasversuchen über die Lösung von Menschenblut durch dagegengerichtetes Kaninchen-

1) Wiener kl. W. Nr. 14, 1908, S. 499.

serum und aktivierendes Menschenserum, war es wiederholt aufgefallen, daß in Reihen mit steigenden Erythrozytenmengen der lytische Effekt bei bestimmten Proben trotz ihres größeren Gehaltes an aktivierendem Bestandteile geringer ausfiel als in den vorhergehenden Röhrchen. Um diese Wahrnehmung genauer zu studieren, stellte Noda[1]) eingehende Versuche an. Ansteigende Mengen von 10proz. Hbl.-Aufschwemmungen wurden mit je 0,2 ccm $^1/_{10000}$ inaktiven Hbl.-Immunserum vom Kaninchen durch ½ Stunde in der Wärme digeriert und nach Zusatz von 0,01 ccm aktives Serum der Lösungseffekt nach 2stündigem Verweilen im Brutschrank beobachtet. Während bei 0,3 ccm 10proz. Hbl. der Lösungseffekt ein vollständiger war, wurden mit der steigenden Erythrozytenmenge (bis 3,0 ccm) immer geringere Anteile — bewertet mittels des Sahlischen Hämoglobinometers — gelöst, so bei 1 ccm Hbl. etwa 50 Proz., bei 2 ccm 25 Proz. und bei 3 ccm Hbl. nur etwa 15 Proz.

Nach diesen Versuchsergebnissen, die eigentlich nur erkennen lassen, daß eine bestimmte Menge Anti-Hammelblutserum und Alexin von steigenden Mengen Blutkörperchen nur bestimmte Anteile zu lösen imstande sind, hat Noda eine Kurvengleichung berechnen lassen, die mit den Versuchsergebnissen in einem bestimmten Widerspruch steht. Daß die Erythrozytenmenge nicht ohne Einfluß auf den Ausfall der Hämolyse ist, haben auch Maslakowitz und Liebermann[2]) erkannt. Sie hatten die Vorstellung, daß eine bestimmte Menge Meerschweinchenserum von bestimmter komplementärer Energie nur eine streng bestimmte Menge sensibilisierten Erythrozyten zu hämolysieren vermag. Jede Veränderung ihres gegenseitigen Verhältnisses sowohl im Sinne der Vergrößerung der Menge der Erythrozyten wie auch im Sinne einer Verringerung der Menge des Meerschweinchenserums führte zu einer partiellen oder kompletten Hemmung der Hämolyse.

Leschly[3]), dem wir eine umfassende Studie über die Beziehungen zwischen Komplement und Ambozeptor verdanken,

---

1) Z. f. Bakt. I. Abt., Orig.-Bd. 50, H. 3, 1909, S. 401.
2) Z. f. I. Bd. 2, 1909, S. 557.
3) Z. f. I. Bd. 24, H. 5, 1916.

hat in einem kurzen Versuch bei absteigenden Mengen einer 5proz. Hbl.-Aufschwemmung und verschiedenen Alexinmengen den jeweiligen Bedarf an Immunserum bestimmt und hierbei gefunden, daß. für eine 2½proz. Aufschwemmung der Bedarf an Immunserum 0,0002, für eine 5proz. Aufschwemmung 0,0004 und für eine 10proz. Aufschwemmung 0,0008 betrug, gleichgültig, ob er 0,05 Komplement, 0,1 oder 0,2 Komplement (Alexin) verwendete. Leschly hat diesen Versuch nur nebenbei erwähnt und hierbei weniger Gewicht auf den Bedarf an Antiserum als an Alexin gelegt. Es schien daher angezeigt, durch besondere Versuche zunächst den Zusammenhang zwischen den Mengen an Hbl. und Antihammelblutserum völlig zu klären. Die nächsten Versuche wollen darüber Aufschluß geben

Gesamtmenge 2,5 ccm, hievon 0,5 ccm der verschieden proz. Hbl.-Aufschwemmungen, 0,5 ccm des Antierythrozytenserums in den angegebenen Verdünnungen, 0,05 ccm des frischen Meerschweinchenserums als Komplement (Alexin), 1 ccm einer 0,85-rozzentigen Kochsalzlösung zur Auffüllung, welcher Zusatz bereits zu den Hbl.-Aufschwemmungen gegeben wurde. Die Ablesungen erfolgten nach Verweilen von ½ Stunde im Brutschrank und nach einer weiteren Stunde bei Zimmertemperatur.

Der Titer des Immunserums war von den Serumwerken in Dresden mit 1 : 2000 angegeben; wiederholte Titerbestimmungen ergaben zumeist den gleichen Titer bei Verwendung

Immunserum-verdünnungen	Nach ½ Stunde Brutschrank								Nach 1 weiteren Stunde Zimmertemperatur							
	Versuch I				Versuch II				Versuch I				Versuch II			
	2,5%	5%	7,5%	10%	2,5%	5%	7,5%	10%	2,5%	5%	7,5%	10%	2,5%	7,5%	5%	10%
1:500	L	L	L	dH	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
1:1000	L	L	L	cH	L	L	L	L	L	L	L	fcH	L	L	L	L
1:1500	L	L	dH	cH	L	L	dH	fcH	L	L	sH	cH	L	L	sH	fcH
1:2000	L	sH	cH	cH	L	sH	fcH	cH	L	L	dH	cH	L	L	dH	cH
1:2500	ssH	fcH	cH	cH	L	dH	cH	cH	L	fcH	cH	cH	L	sH	fcH	cH
1:3000	dH	cH	cH	cH	L	fcH	cH	cH	L	cH	cH	cH	L	dH	cH	cH
1:3500	cH	cH	cH	cH	L	cH	cH	cH	L	cH	cH	cH	L	cH	cH	cH
1:4000	cH	cH	cH	cH	sH	cH	cH	cH	L	cH	cH	cH	L	cH	cH	cH

von stets 0,05 ccm Aktivserum, selten einen niedrigeren oder höheren Titer.

Die für die Versuche gestellte Frage läßt sich nach den Ergebnissen eindeutig beantworten: Bei steigenden Hbl.-Mengen ist in demselben Verhältnis eine steigende Menge von Immunserum zur Hämolyse bei einem bestimmten Komplementüberschuß erforderlich. Für die Gesamtmenge von 2,5 ccm waren

für die 2,5proz.	Hbl.-Aufschwemmung	0,00025	Immunserum,	Titer	1:4000
„ „ 5proz.	„ „	0,0005	„	„	1:2000
„ „ 7,5proz.	„ „	0,001	„	„	1:1000
„ „ 10proz.	„ „	0,002	„	„	1:500

notwendig. Allerdings war der Titer für die 10proz. Hbl.-Aufschwemmung beim II. Versuch nicht 1:500, sondern 1:1000, doch zeigen die nächsten Hemmungswerte mit *s H*[1]) und *f c H* für die beiden letzten Aufschwemmungen derartige Unterschiede, daß für die 10proz. Aufschwemmung ein Mehrbedarf an Immunserum ebenfalls zu erkennen ist. Die gleichgebliebene Komplementmenge, die für die 2,5proz. Hbl.-Aufschwemmung einen größeren Überschuß als für die 10proz. darstellt, scheint den Ausfall nicht beeinflußt zu haben.

Umstritten ist die Frage, ob zwischen Komplementmenge und gelöster Blutmenge ein bestimmtes Verhältnis besteht. Scheller[2]) hat diese Frage folgendermaßen zu lösen versucht: Blutkörperchen in 10proz. Aufschwemmung wurden mit einer gleichen Menge von Immunkörperlösung von 1:1000

---

1) Die Ablesung gibt den Zustand der Hbl.-Körperchen direkt an — keine Lösung des Hbl. als cH = komplette Hemmung, Spuren einer Lösung mit fcH = fast komplette Hemmung, stärkere Lösung, aber noch mit Hbl. am Grunde, sog. kleine Kuppe, dH = deutliche Hemmung, und fast vollständige Lösung in 2 Abstufungen mit sH = schwache Hemmung und ssH = sehr schwache Hemmung. Mit diesen Bezeichnungen ist lediglich der Zustand der Lösung oder des Unbeeinflußtseins als Hemmung der Blutkörperchen zum Ausdruck gebracht.

2) Zentralbl. f. Bakt. Abt. I, 56. Bd., S. 124.

sensibilisiert; von diesen sensibilisierten Blutkörperchen wurden Mengen von ½ ccm bis 8 ccm steigend genommen, das Volumen mit physiologischer Kochsalzlösung auf 9 ccm gebracht und nun zu dieser Menge der sensibilisierten Blutkörperchenaufschwemmung absteigende Mengen von Alexin und zwar von 0,04 ccm bis 0,00125 ccm, aufgefüllt auf 1 ccm gegeben. Es zeigte sich nun, daß die Komplementmenge von 0,04, 0,02 und 0,01 ccm auch bei der größten Menge sensibilisierter Blutkörperchen ausreichte, um vollständige Hämolyse herbeizuführen. Die kleineren Alexinmengen jedoch erzielten einen immer unvollständigeren Effekt und in der keinsten Dosis nur mehr Spuren einer Hämolyse. Scheller folgert aus diesem Ergebnis, daß das Komplement, sofern die angewandte Konzentration, in welcher es wirkt, dieselbe bleibt, quantitativ die gleiche Wirkung entfaltet, unabhängig von der Menge der sensibilisierten Blutkörperchen, auf welche es wirkt. Hier wird bereits die Bedeutung der Konzentration des Komplements hervorgehoben, die wir später ausführlich erörtern wollen. Scheller erwähnt im Texte jedoch andere Versuche, wonach bei gleicher Immunkörpermenge beim Zusetzen von verschieden großen Mengen von Blutkörperchen eine mit der Menge der Blutkörperchen steigende Konzentration von Komplement zur Lösung notwendig war.

Andere Untersucher haben die Angaben Schellers nur teilweise bestätigen können. Liefmann und Andreew[1]) fanden, daß das Komplement, welches mehr Blutkörperchen als die Menge, für welche es bestimmt ist, zu lösen vermag, komplette Lösung nur bei einer unbedeutend größeren Menge hervorrufen kann.

Leschly[2]) kam zu den gleichen Ergebnissen und fand, daß die für eine bestimmte Blutmenge erforderliche Komplementmenge im Maximum nur die doppelte Blutmenge komplett zu lösen vermöge. Die relativ gelösten Blutmengen schwankten jedoch in den einzelnen Versuchen recht bedeutend. Eigene Versuche hatten folgende Ergebnisse:

---

1) Z. f. I. Orig.-Bd. 11, 1911, S. 355.
2) l. c.

Tabelle II.

Komplement-Abstufungen	Nach ½ Stunde Brutschrank								Nach 1 weiteren Stunde Zimmertemperatur							
	Versuch I				Versuch II				Versuch I				Versuch II			
	Hbl.-Aufschwemmungen in Prozenten															
	2,5	5	7,5	10	2,5	5	7,5	10	2,5	5	7,5	10	2,5	5	7,5	10
0,020	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
0,018	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»
0,016	»	»	»	»	»	»	»	ss H	»	»	»	»	»	»	»	»
0,014	»	»	»	»	»	»	»	s H	»	»	»	»	»	»	»	»
0,012	»	s H	»	»	»	»	ss H	fc H	»	»	»	»	»	»	»	»
0,010	»	fc H	»	»	»	»	d H	c H	»	d H	»	»	»	»	»	fc H
0,008	»	c H	d H	»	s H	d H	c H	»	»	c H	»	»	»	ss H	s H	c H
0,006	s H	»	c H	c H	fc H	c H	»	»	»	»	fc H	fc H	s H	d H	c H	»
0,004	fc H	»	»	»	c H	»	»	»	fc H	»	c H	c H	c H	c H	»	»
0,002	c H	»	»	»	»	»	»	»	c H	»	»	»	»	»	»	»

Gesamtmenge: Stets 2,5 ccm und zwar 0,5 ccm verschieden proz. Hbl.-Aufschwemmung, 0,5 ccm des 4fachen Ambozeptortiters der jeweiligen Hbl.-Menge, abgestufte Komplementmengen und Ergänzung auf die Gesamtmenge mit physiologischer Kochsalzlösung.

Der 4fache Ambozeptor wurde aus bestimmten, später zu erörternden Gründen gewählt.

Der Komplementbedarf war ungeachtet der steigenden Blutkörperchenmenge bei diesem Ambozeptorüberschuß ein annähernd gleicher oder nur wenig erhöhter. Zum mindesten ist ersichtlich, daß nicht entsprechend dem für die größere Erythrozytenmenge gesteigerten Ambozeptorbedarf auch in gleicher Weise gesteigerte Alexinmengen für die Hämolyse erforderlich waren. Gleichzeitige Versuche mit gleich gesteigerten Blutkörperchenmengen und der einfachen im Vorversuch ermittelten Ambozeptordosis ergaben ebenfalls nur einen wenig gesteigerten Komplementbedarf. Die Reaktion verlief nur träger. Spätere Versuche mit 2½, 5, 10 und 15proz. Hbl.-Aufschwemmungen ergaben hinsichtlich des in gleicher Weise gesteigerten Bedarfs an Immunserum stets dasselbe Resultat. Der Komplementbedarf war bei Verwendung der 4- oder 5fachen im Vorversuch ermittelten

Ambozeptordosis bei steigenden Erythrozytenmengen stets nur wenig gesteigert.

Wir enthalten uns einstweilen, weitergehende Schlüsse aus diesen Resultaten zu ziehen. Wir wollen vielmehr auf die engeren Beziehungen zwischen Komplement (Alexin) und Immunserum (Ambozeptor) bei gleichbleibender Erythrozytenmenge näher eingehen.

2. Hämolytisches, inaktiviertes Immunserum (Ambozeptor, Präparin) und Aktivserum (Komplement, Alexin).

Die quantitativen Beziehungen dieser beiden Agentien im hämolytischen System wurden zunächst von Dungern[1]) angedeutet, als er den Beweis zu bringen suchte, daß der Immunkörper und das Komplement (Alexin) im Immunserum quantitativ von einander unabhängig sind. Die hämolytische Wirkung von Immunseren wurde durch Zusatz von Komplement (normales Kaninchenserum) in einzelnen Fällen ganz außerordentlich gesteigert. Konnte frisches Serum eines mit Rinderblut vorbehandelten Kaninchens z. B. die 10fache Menge 5proz. Rinderblutes vollständig lackfarben machen, so vermochte es bei genügendem Zusatz von Aktivserum, die 320fache Menge vollkommen aufzulösen. Je mehr Immunkörper in dem einzelnen Immunserum vorhanden war, desto bedeutender wurde die Verstärkung der hämolytischen Wirkung durch den Komplementzusatz. Gruber[2]) wies bei der Besprechung der Wirkung bakterizider Immunsera darauf hin, daß hochgradig präparierte (sensibilisierte) Menschenblutkörperchen durch ein Minimum von aktivem Normalserum (0,02 bis 0,04 ccm) gelöst werden können. Auch schon vorher hat Gruber[3]) nach den Erfahrungen mit Agglutinine betont, daß die Wirkung der Immunsera streng den angewendeten Mengen proportional ist.

---

1) M. med. W. Nr. 20, 1900, S. 677.
2) W. kl. W. Nr. 15, 1902, S. 387.
3) M. med. W. Nr. 46, 47, 48 u. 49, 1901.

Eingehender behandelten Morgenroth und Sachs[1]) die Frage der quantitativen Beziehungen von Ambozeptor und Komplement. Bei ihren Versuchen wurde stets mit 5proz. Blutkörperchenaufschwemmungen und gleichen Flüssigkeitsvolumen gearbeitet. Versuche mit Hammelblut, Hammelblut-Antiserum und Meerschweinchenserum als Komplement ergaben bei steigenden Ambozeptormengen (meist von 0,05 ansteigend bis 0,4 oder 0,5) im allgemeinen einen abnehmenden Komplementbedarf. Doch war der Komplementbedarf für die gleiche Menge von 0,05 ccm Ambozeptor in 4 Versuchsreihen sehr verschieden (0,008, 0,025, 0,1 und 0,08). Wurde die Ambozeptormenge ungefähr um das 10fache erhöht, so war der Komplementbedarf zweimal um das 6fache, ein drittes Mal um etwa das 10fache vermindert. Die Beziehungen für diese Kombinationen wurden dahin ausgedrückt, daß bei Gegenwart größerer Ambozeptormengen kleinere Komplementdosen zur Hämolyse genügen. Viel weniger ausgesprochen war jedoch die Erscheinung mit der Kombination Ochsenblut, entsprechenden Antiserum und Meerschweinchenserum als Komplement. Bei Erhöhung der Ambozeptormengen bis auf die 100fache Dosis verringerte sich der Komplementbedarf bei 2 Versuchen nur um das 3 bzw. 4fache, in einem Falle sogar nur um das 1½fache. Als besonders charakteristisch wird von den Autoren die Erscheinung hervorgehoben, daß der geringste Komplementbedarf bei einem geringen Multiplum der Ambozeptoreinheit beinahe erreicht ist und mit weiterer Vermehrung des Ambozeptors sich nicht mehr wesentlich ändert. Eine Erklärung dieser Erscheinung versuchten Morgenroth und Sachs mit dem Hinweis auf die schwankende Menge der Rezeptoren für die Blutkörperchen, auf die verschiedenen Aviditätsverhältnisse von Ambozeptor und Komplement und schließlich mit dem Hinweis auf die Vielheit der Ambozeptoren. Die zum Schluß ausgesprochene Ansicht, daß sich die verschiedenen Phänomene in Verhältnis von Ambozeptormenge und Komplementbedarf mit Berücksichtigung der drei erwähnten Faktoren in ungezwungener Weise er-

---

1) B. kl. W. Nr. 35, 1902, S. 817.

klären lassen, können wir nicht teilen. Eine einfachere Erklärung soll am Schlusse dieser Abhandlung versucht werden.

In der Folge wurden von Noda[1]) die Lösungseffekte bei fallenden Mengen von Immunserum festzustellen gesucht, die ebenfalls theoretisches Interesse beanspruchen. Zunächst ist die Wahrnehmung von Noda bemerkenswert, daß man gelegentlich Meerschweinchenseren antrifft, die eine gewisse Menge von Hbl.-Körperchen im Kontrollversuch ohne hämolytisches Immunserum direkt zu lösen vermögen. Mit diesem Hinweis ist angedeutet, daß eben hie und da Aktivsera mit einer nicht unbeträchtlichen Menge an Normalambozeptoren gefunden werden. Diese Sera wurden aus den Versuchen ausgeschaltet. In einer Versuchsreihe verwendete er eine konstante Menge von Erythrozytenbrei, ebenso eine konstante Menge von Meerschweinchenserum als Alexin (Komplement) 0,05 ccm und wechselte lediglich die Konzentration des Immunserums von einer Verdünnung 1:10000 in 5 Stufen bis zu 1:50000. Hiebei ergab sich, daß der Lösungseffekt nahezu völlig proportional mit der abnehmenden Menge an Immunserum geringer wurde. Dieses Versuchsergebnis deckte sich mit einem Befund von Liebermann und Fenyvessy[2]). Diese beiden Autoren fanden ebenfalls bei Versuchen mit konstanten Komplementmengen und Verdünnungen eines inaktivierten Immunserums bei gleichen Erythrozytenmengen proportional diesen Verdünnungen auch eine Verringerung des Lösungseffektes auf Grund von Hämoglobinbestimmungen. Auch Manwaring[3]) hatte bei ähnlichen Versuchen ein gleiches Ergebnis. Alle diese Versuche brachten eigentlich nur die Bestätigung, daß eine Proportionalität zwischen den Blutkörperchen- und Immunserummengen für die Hämolyse besteht, die bereits im Jahre 1901 von Gruber erkannt worden war. Bei steigenden Erythrozytenmengen muß auch die Menge an Immunserum entsprechend gesteigert werden, und bei gleichen Erythrozytenmengen und fallenden Ambozeptordosen nimmt der hämolytische Effekt in gleichem Maße ab.

---

1) Z. f. Bakt. Orig.-Bd. 50, H. 3, S. 405.

2) Biochem. Ztschr. V. Bd., H. 1, 1907.

3) Zentralbl. f. Bakt. Abt. 1, Orig.-Bd. 40, 1906.

In Fortsetzung der Ergebnisse und Untersuchungen von Morgenroth und Sachs fand Noguchi[1]), daß durch Vermehrung der Ambozeptormengen bis zum 10fachen Titer die Komplementmenge bis auf ein Fünftel, bei einer Steigerung bis zum 20fachen Titer sogar bis auf ein Zehntel vermindert werden konnte. Man war vielfach zur Annahme geneigt, daß innerhalb gewisser Grenzen die Ambozeptormenge und der zur Hämolyse erforderliche Komplementbedarf annähernd umgekehrt proportional sind. Eine völlige Sicherheit war jedoch weder durch die Experimente von Morgenroth und Sachs noch von Noguchi gegeben. Eine nähere Wechselbeziehung zwischen Ambozeptor und Komplement wurde jedoch energisch bestritten. So hat Thomsen[2]) bei Untersuchungen an mehr als 20 Immunseren und vielen Meerschweinchenseren gefunden, daß die Hämolyse, von einer bestimmten Komplementmenge hervorgerufen, beinahe dieselbe sei, gleichgültig ob er größere oder geringere Ambozeptormengen (1 bis 32 Einheiten) verwandte. Die von anderen Untersuchern festgestellte starke Veränderlichkeit führt Thomsen auf den Umstand zurück, daß die Reaktionsgeschwindigkeit bei Verwendung größerer oder kleinerer Ambozeptormengen zu wenig berücksichtigt wurde. Leschly[3]) fand durch Untersuchungen von mehr als 40 verschiedenen Immunseren und vielen Meerschweinchenseren, daß der mittels einer bestimmten Menge Komplement oder Ambozeptor erreichte Hämolysegrad nur in geringem Maße von der Menge des anderen Faktors abhängig ist, insofern diese Menge die für die totale Hämolyse erforderliche Menge übersteige.

Der Komplementbedarf zur Erreichung der kompletten Hämolyse bei gleicher Blutmenge (0,5 ccm einer 5proz. Hbl.) und steigender Ambozeptoreinheiten (1 bis 20) war auch nach den ausgedehnten Versuchen von Leschly fast stets der gleiche. Als Ausnahme bezeichnete Leschly, wenn die Hämolyse mit einer Ambozeptoreinheit bisweilen etwas geringer als mit 1½ bis 20 Einheiten war. So fand Leschly hie und da, daß z. B. der Komplementtiter bei Verwendung einer Ambozeptoreneinheit 0,03

1) Zt. f. Imm. Orig.-Bd. 7, 1910, S. 353.
2) Zt. f. Imm. Bd. 7, 1910, S. 389. — 3) l. c.

(unverdünnt) betrug und erst von der 1½fachen Ambozeptoreinheit an gleichmäßig bis zur 32sten 0,025 oder 0,02 ccm. Die Versuchsresultate wurden hiebei stets nach einem Aufenthalte der Röhrchen 2 Stunden bei 37° und weiterem Verweilen bis zum nächsten Tage im Eisschrank bei 0 bis 2° abgelesen. In Übereinstimmung mit Thomsen betonte jedoch Leschly, daß die Reaktionsgeschwindigkeit von der Zahl der zur Verwendung kommenden Ambozeptoreinheiten in hohem Grade abhängig sei. Je größer der Ambozeptorüberschuß, desto schneller erfolgt der Eintritt der Hämolyse.

Trotz der zahlreichen von Thomsen und Leschly angestellten Versuche schien in Anbetracht der grundsätzlichen Wichtigkeit der Beziehungen zwischen Komplement und Ambozeptor und in Anbetracht des Gegensatzes mit früheren Untersuchungen eine Nachprüfung wünschenswert.

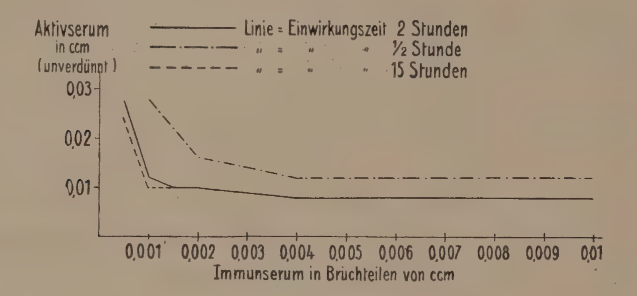
Die Resultate von 2 Versuchsreihen sind in der folgenden Tabelle im wesentlichen wiedergegeben.

In Übereinstimmung mit den von Leschly angegebenen seltenen Fällen ist der Komplementbedarf bei Verwendung des einfachen Ambozeptortiters mit 0,02 bzw. 0,033 ccm Komplement wesentlich höher als bei der Verwendung vielfacher Mengen des Ambozeptortiters. Aber dieser Komplementbedarf ist vom 2fachen bis zum 12fachen Ambozeptortiter mit Schwankungen zwischen 0,508 und 0,014 nahe unverändert derselbe. Auch bei 20fachem Ambozeptortiter war der Komplementverbrauch nur 0,008 ccm. Die Resultate von Thomsen und Leschly können somit nur zum Teil bestätigt werden. Eine weitgehende Gliederung der Ablesezeiten (in die Tabelle nicht aufgenommen) ergab fernerhin, daß der Komplementbedarf bei Verwendung vom 2 bis 4fachen Ambozeptortiter aufwärts unverändert blieb, gleichgültig ob nach 1½, 2 oder 14 Stunden die Resultate abgelesen wurden. Die Reaktion ist somit selbst bei dem geringen Ambozeptorüberschuß von 2 bis 4 Einheiten nach 1½ Stunden (½ Stunde Brutschrank, 1 Stunde bei Zimmertemperatur) im wesentlichen abgeschlossen. Bei den Ablesezeiten nach 10, 20 und 30 Minuten jedoch sind je nach dem Ambozeptorüberschuß größere Unterschiede in dem

Gesamtmenge 2,5 ccm; Bestandteile: 0,5 ccm einer frischen Hbl.-Aufschwemmung, 0,85 proz. NaCl-Lösung zur entsprechenden Ergänzung, Zusatz von 0,5 ccm der verschiedenen Ambozeptorverdünnungen, Sensibilisierung eine Stunde bei 37 °, schließlich Zusatz der abgestuften Komplementmengen.

Komplement-Abstufungen	nach $^1/_2$ Stunde Brutschrank												nach 1 weiteren Stunde Zimmertemperatur											
	Versuch I						Versuch II						Versuch I						Versuch II					
	Titerdosis des Immunraumes (Ambozeptors)																							
	1	2	3	4	8	12	1	2	3	4	8	12	1	2	3	4	8	12	1	2	3	4	8	12
0,036	L	L	L	L	L	L	sH	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
0,033	L	»	»	»	»	»	dH	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»
0,030	ssH	»	»	»	»	»	dH	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	L	»	»	»	»	»
0,028	dH	»	»	»	»	»	fcH	L	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	ssH	»	»	»	»	»
0,026	dH	»	»	»	»	»	fcH	ssH	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	sH	»	»	»	»	»
0,024	fcH	»	»	»	»	»	fcH	ssH	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	dH	»	»	»	»	»
0,022	fcH	»	»	»	»	»	cH	sH	L	»	»	»	»	»	»	»	»	»	fcH	»	»	»	»	»
0,020	cH	L	»	»	»	»	»	fcH	ssH	»	»	»	L	»	»	»	»	»	cH	»	»	»	»	»
0,018	cH	ssH	»	»	»	»	»	fcH	ssH	»	»	»	sH	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»
0,016	»	sH	»	»	»	»	»	fcH	dH	L	»	»	dH	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»
0,014	»	dH	L	»	»	»	»	cH	fcH	sH	»	»	fcH	»	»	»	»	»	»	»	L	»	»	»
0,012	»	dH	sH	»	»	»	»	»	cH	fcH	L	L	fcH	»	»	»	»	»	»	L	ssH	»	»	»
0,010	»	fcH	dH	L	L	L	»	»	»	fcH	sH	ssH	cH	L	L	L	L	»	»	sH	sH	L	L	»
0,008	»	cH	fcH	dH	sH	ssH	»	»	»	cH	fcH	fcH	»	dH	dH	sH	ssH	L	»	fcH	fcH	fcH	ssH	L
0,006	»	»	cH	cH	fcH	dH	»	»	»	»	cH	cH	»	cH	fcH	fcH	dH	sH	»	cH	cH	cH	dH	dH

Sinne zu finden, daß die Reaktion bei Verwendung einer Ambozeptoreinheit nur sehr träge verläuft und mit zunehmendem Ambozeptorüberschuß immer schneller und nach wenigen Minuten Hämolyse erreicht wird. Bei Verwendung von 4 Ambozeptoreinheiten aufwärts sind die Unterschiede in den Reaktionsgeschwindigkeiten nur mehr unbedeutend. Den Einfluß der Einwirkungszeiten und den Verlauf der Beziehungen zwischen Komplement und Ambozeptorüberschüssen bringt vielleicht besser die folgende Kurventafel zum Ausdruck.



Bei nur ½stündiger Einwirkungszeit ist der Endpunkt der Reaktion noch bei keinem Mengenverhältnis diesmal völlig erreicht, der Kurvenverlauf ist jedoch im wesentlichen derselbe wie bei 2 und 15 Stunden Einwirkung. Bei den Ablesungen nach 2 und 15 Stunden sind die Resultate nur unmerklich verschieden.

Es ergibt sich daher: Bei Verwendung des einfachen Ambozeptortiters ist der Komplementbedarf zur vollständigen Lyse wesentlich höher als bei Verwendung des 2- und 3fachen Ambozeptortiters. Größere Ambozeptorüberschüsse vom 4- oder 5fachen Titer an bis zum 20fachen Titer und darüber erfordern zur vollständigen Lösung bei Ablesezeit nach 1½ oder 2 Stunden annähernd die gleiche Komplementmenge. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird bei steigenden Ambozeptorüberschüssen immer größer, bedeutendere Unterschiede sind jedoch nur bis etwa zum 4fachen Ambozeptortiter zu finden.

Ausgedehntere Untersuchungen wurden namentlich von Leschly angestellt, um den Ambozeptorverbrauch bei verschie-

denen Komplementüberschüssen und gleicher Blutmenge klarzustellen. Er fand, daß der Ambozeptortiter bei Verwendung von Komplementmengen von 0,08 bis 0,02 ccm (unverdünnt) der gleiche blieb; nur vollzog sich der Ablauf der Reaktion bei größeren Komplementmengen viel rascher als bei kleineren. Leschly glaubte auch annehmen zu können, daß für jede Komplementmenge eine optimale Ambozeptormenge entspreche. Diese Annahme läßt jedoch noch nicht die Deutung zu, daß außer quantitativen Beziehungen der Komplement- und Ambozeptoreinheiten auch individuelle Verschiedenheiten eine Rolle spielen. Tatsächlich ist jedoch diese Ansicht vielfach in der Literatur zu finden. Namentlich Scheller und Goldschmidt[1]) haben auf Grund von 2 Versuchreihen hervorgehoben, daß sehr große Variationen bei Meerschweinchenkomplementen und Kaninchenambozeptoren vorkommen. In einer Versuchsreihe wurde bei Verwendung von 4 verschiedenen Komplementsera (stets 0,1 ccm) gefunden, daß der eine Ambozeptor zweimal den Titer von 1 :2000 und je einmal von 1 :1500 bzw. 1 :3000 zeigte, der zweite Ambozeptor die Titer 1 :600, 1 :500 und 1 :300 (Gesamtmenge 3 ccm). In einer zweiten Versuchsreihe würde der Komplementtiter bestimmt bei 4 Komplementen durch Zusatz von 2 Ambozeptoreinheiten und diese nunmehr viel geringere Komplementmenge zur Austitrierung von 4 verschiedenen Immunseren verwendet. Die verwendete Ambozeptormenge war nunmehr verhältnismäßig groß. Von dem einen Ambozeptor wurden benötigt die Verdünnungen 1 :300, 1 : 60, 1 : 120 und 1 : 120 für Komplement 1, vom zweiten Ambozeptor die Verdünnungen 1 : 30, 1 : 30, 1 : 60, 1 : 30 für Komplement 2, vom dritten Ambozeptor die Verdünnungen 1 : 30, 1 : 90, 1 : 90 und 1 : 90 für Komplement 3 und vom vierten Ambozeptor die Verdünnungen 1 : 30, 1 : 90 und 1 : 90 für Komplement 4. Diese 2 Versuchsreihen wurden als Beispiele ausgedehnter Versuche mitgeteilt. Das Ergebnis wurde dahin zusammengefaßt: Das Verhältnis zwischen Immunkörperdosis und Komplementbedarf ist bei ein und demselben System nicht

---

1) Z. f. Bakt. Orig.-Bd. 58, 1911, S. 569.

konstant, sondern variiert je nach Immunkörper und je nach dem jeweiligen Komplement innerhalb weiter Grenzen. Für die Serodiagnostik der Syphilis folgerten Scheller und Goldschmidt aus diesem Ergebnis, daß es nun verständlich sei, wenn bei Verwendung eines Multiplum des Ambozeptortiters einmal der Komplementbedarf gering, ein ander Mal wieder groß sei. Deshalb kämen auch die Unterschiede von Tag zu Tag, von Institut zu Institut zustande.

Um diese Angaben nachzuprüfen, hat Leschly einige 20 Ambozeptorsera und mehr als 50 Meerschweinchensera nach derselben Versuchstechnik wie Scheller und Goldschmidt in ihren Beziehungen untersucht. Leschly fand nur recht unbedeutende Variationen im Titer, die nicht größer waren, als sie innerhalb des Versuchsfehlers liegen könnten. So war (Versuch XXI S. 519) der Ambozeptorverbrauch mit 0,5 ccm 5proz. Hbl.-Aufschwemmung (Gesamtmenge von 2,5 ccm, Komplementtiter mit 2 Ambozeptoreinheiten bestimmt, Verwendung abgestufter Ambozeptormengen) bei 6 verschiedenen Meerschweinchenseren für jeden von 6 Ambozeptoren fast stets der gleiche, anderseits wieder der Komplementverbrauch mit abgestuften Komplementmengen bei Verwendung des Ambozeptortiters für jedes Meerschweinchenserum auch immer derselbe.

Im Vergleich mit den Befunden von Scheller und Goldschmidt nimmt Leschly an, daß die ersteren bei ihren Versuchen die Ablesezeiten nicht angaben und auch die vom Komplement- bzw. Ambozeptorüberschuß abhängigen verschiedenen Reaktionszeiten nicht berücksichtigten. Die nicht bedeutenden Unterschiede könnten zwanglos dadurch erklärt erden. Leschly schließt auf Grund seiner ausgedehnten Untersuchungen, daß weder bei Aktivseren noch bei Immunseren individuelle Eigentümlichkeiten von irgendwie praktischer Bedeutung zu erkennen waren.

Doch ist bei seinen Versuchen zu berücksichtigen, daß der Ambozeptor- bzw. der Komplementüberschuß bei den einzelnen Bestimmungen des Komplement- bzw. Ambozeptortiters stets die gleichen waren. Die gleichen Werte sind verständlich. Wir

haben durch Monate gelegentlich kleinere Versuche unter gleichen Bedingungen ausgeführt, die sämtlich ergeben haben, daß bei annähernd gleichem Komplementüberschuß der Ambozeptortiter nur geringe Schwankungen aufweist, und daß anderseits bei einem bestimmten Ambozeptorüberschuß verschiedener Immunseren der Komplementtiter desselben Meerschweinchenserums zu gleicher Zeit die gleiche Höhe aufweist. Eine gewisse Konstanz ist nach dieser Richtung vorhanden, individuelle Einflüsse machen sich nur insoweit bemerkbar, als der Komplementgehalt der einzelnen Meerschweinchensera ein schwankender ist. Anders liegt jedoch die Frage, ob stets bei verschiedenen Überschüssen des gleichen Meerschweinchenserums auch der gleiche Ambozeptorbedarf gefunden wird. Nach den vorher angeführten Versuchen fand Leschly bei Verwendung von Komplementmengen von 0,08 bis 0,02 ccm (unverdünnt) nach 2 Stunden im Brutschrank den gleichen Ambozeptorbedarf. Unterschiede waren jedoch vorhanden hinsichtlich der Reaktionszeit bis zum Eintritt der Lösung.

Zum Erkennen der Beziehungen zwischen Komplement und Ambozeptor bei Verwendung abgestufter Komplementmengen desselben Meerschweinchenserums (oder eines Gemisches sind die Grenzen jedoch weiter zu ziehen. Auch Versuche unsererseits mit Komplementmengen von 0,05 bis 0,01 ergaben, da sie nur Ausschnitte für das Verhalten zeigten, keinen völligen Einblick. Der folgende Versuch wurde derart angestellt, daß für 0,005 bis 0,1 ccm eines frischen Meerschweinchenserums in Abstufungen und 0,5 ccm einer 5proz. Hbl.-Aufschwemmung der Ambozeptorbedarf zur vollständigen Lösung bei vorhergehender Sensibilisierung des Hbl. ermittelt wurde. Das Ergebnis ist aus der nachstehenden Tabelle ersichtlich.

Betrachten wir zunächst die Ergebnisse nach 2 Stunden Einwirkungszeit (hievon 1½ Stunden im Brutschrank, ½ Stunde bei Zimmertemperatur). Der Titer dieses Immunserums (Dresdener Serumwerke) war bereits wiederholt bei 0,05 ccm Komplement mit 1 : 1000 bestimmt. Derselbe Titer wurde auch bei diesem Versuch gefunden. Aber auch mit 0,04 und 0,06 ccm

Ambozeptorverbrauch bei verschiedenen Komplementabstufungen.

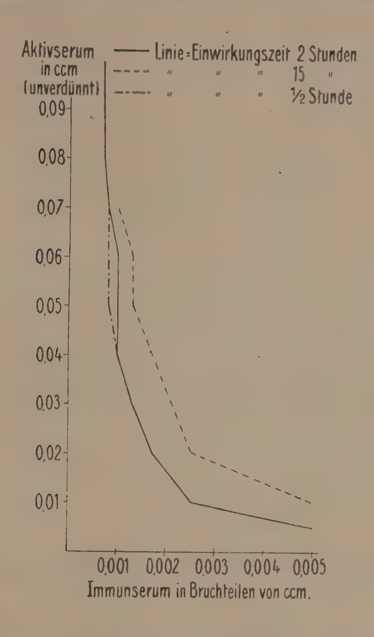
Komplementabstufungen	Ambozeptortiter nach			
	$^1/_2$ St.	$1^1/_2$ St.	2 St.	14 St.
0,1 ccm unverd.	—	0,0007	0,0007	0,0007
0,08 » »	—	—	0,0007	0,0007
0,07 » »	0,001	0,001	0,0008	0,0008
0,06 » »	0,0013	0,0013	0,001	0,0008
0,05 » »	0,0013	0,0013	0,001	0,0008
0,04 » »	0,0017	0,0013	0,001	0,001
0,03 » »	—	—	0,0013	0,0013
0,02 » »	0,0025	0,0017	0,0017	0,0017
0,01 » »	0,005	0,0025	0,0025	0,0025
0,005 » »	0,005	0,005	0,005	0,005

Komplement ergab sich der gleiche Titer. Selbst Komplementmengen bis zu 0,1 ccm bewirkten nur eine geringe Erhöhung des Titers von 0,001 auf 0,0007 (1 : 1000 auf 1 : 1400) also um etwa 40 Proz. weniger Immunserum. Anderseits ist jedoch der Immunserumbedarf bei Verwendung von 0,01 Komplement von 0,001 auf 0,0025 erhöht (die 2½fache Titermenge). Bei Verminderung des Komplements auf 0,005 beträgt der Immunserumbedarf den 5fachen Titerwert. Eine gewisse Gesetzmäßigkeit in den Beziehungen läßt sich bereits vermuten. Namentlich ist die Erscheinung auffällig, daß, wie bei Verwendung von 4- und mehrfachen Ambozeptortitermengen die Mindestmenge an Komplement annähernd die gleiche bleibt (Tabelle 17), so daß bei nach oben abgestuften Komplementüberschüssen der Ambozeptorbedarf sich von einer bestimmten Grenze an kaum weiter vermindert. Auch bei der Ablesung der Resultate nach anderen Reaktionszeiten ergibt sich annähernd dasselbe Resultat.

Noch deutlicher kommen diese Beziehungen in der folgenden Kurventafel zum Ausdruck.

Die Grenzen der Wechselbeziehung von Ambozeptor und Komplement sind in der Kurve leicht zu erkennen; sie sind ungefähr durch die Werte 0,004 Immunserum (4facher Ambozeptortiter) und etwa auch 0,04 ccm Komplementserum gezogen. (Bei diesem Versuch genügten 0,01 ccm Komplementserum, um 0,5 ccm Hbl. bei Verwendung des 4fachen Ambozeptortiters nach 1½ Stun-

den zu aktivieren bzw. zu lösen.) Dies ist auch aus der Kurventafel ersichtlich, denn 0,004 Immunserum benötigten etwa 0,0075 Komplement nach 2 bzw. 15 Stunden. Weiters erforderten 0,0025 Immunserum (2½ Ambozeptoreinheiten) 0,01 ccm Komplement, 0,0017 Immunserum (1,7 Einheiten) 0,02 ccm Komplement, 0,0014 Immunserum (1,4 Einheiten) 0,03 Komplement und 0,001



Immunserum (einfache Einheit) 0,04 Komplementserum. Wird weniger Immunserum als 1 Einheit genommen, so steigt der Komplementbedarf schnell in die Höhe, bei 0,0007 Immunserum bereits 0,1 ccm Komplementserum. Ein Minimum von Immunserum scheint selbst bei stärksten Komplementüberschüssen erforderlich zu sein. Bei Verwendung größerer Mengen von Komplementserum ist noch zu berücksichtigen, daß das normale Meerschweinchenserum auch Normalambozeptoren enthält. Leschly (S. 503) suchte diesen Einfluß auch festzustellen und fand, daß bis zu einer Komplementmenge von 0,16 ccm sich bei mit Hbl. behandeltem oder nicht behandeltem Komplementserum keine Unterschiede im Ambozeptorbedarf feststellen ließen,

erst bei einer Komplementmenge darüber hinaus ergab sich ein geringerer Immunserumbedarf bei unbehandeltem Komplementserum. Dieses Ergebnis erscheint verständlich. Untersuchungen einer Reihe von Meerschweinchenseren auf Normalpräparine ergaben im Mittel für 0,1 ccm Serum einen Komplementverbrauch von 0,024 ccm der Verd. 1:10, — eine Menge, die etwa $^1/_4$ der Komplementmenge ausmacht, die für die Lyse von 0,5 ccm einer 5proz. Hbl.-Aufschwemmung bei Verwendung des 4fachen Ambozeptortiters erforderlich ist. Bei den vorerwähnten Versuchen wurde im Maximum 0,1 Serum verwendet, die Normalambozeptormenge, die 0,024 ccm Komplementserum zukommt, ist als Plus so gering daß sie bis zu diesen Komplementmengen keinen wesentlichen Einfluß ausüben kann.

Immerhin werden mitunter doch auch größere Mengen an Normalambozeptoren (Normalpräparine) in Meerschweichenseren gefunden. Diese hämolytische Kraft kann namentlich bei Bestimmungen des Ambozeptortiters recht störend wirken. Auch bei manchen Experimenten scheint das Vorkommen von Normalambozeptoren eine gewisse Rolle gespielt zu haben, die nicht immer richtig erkannt wurde.

B. Einfluſs der Flüssigkeitsmenge.

Bekanntlich ist wie für die Agglutination auch für jeden hämolytischen Versuch als Medium eine isotonische oder schwach hypertonische Salzlösung notwendig. Auf die einzelnen Versuche von Kiß[1]) und auf eigene Versuche über den Einfluß der Kochsalzkonzentration auf die Komplementwirkung wurde bereits hingewiesen. Kiß gelangte in weiteren Untersuchungen jedoch zu dem Ergebnis, daß für die Geschwindigkeit und Stärke der Hämolyse lediglich die Konzentration des Komplements ausschlaggebend ist und nicht die absolute Menge desselben.

Scheller[2]) prüfte diese letztere Angabe von Kiß durch Versuche nach. Zunächst bestimmte er den Verbrauch von

---

1) Zt. f. Imm. Bd. 3, 1909, S. 558.
2) Z. f. Bakt. Orig.-Bd. 56, 1910, S. 120.

Komplement bei Verwendung des einfachen Ambozeptortiters für eine 10proz. Hbl.-Aufschwemmung in der Gesamtmenge von 3 und 10 ccm. Er fand, daß bei letzterer Menge der Komplementverbrauch mit $^1/_{50}$ ccm mehr als dreimal so groß war, wie bei einer Gesamtmenge von 3 ccm. In einer weiteren Versuchsreihe verwendete er Ambozeptorverdünnungen von 1½, 2, 3, 6 und 60 Ambozeptoreinheiten in einer Gesamtmenge von 3, 6, 12 und 24 ccm und fand auch hiebei z. B. bei Verwendung von 2 Ambozeptoreinheiten in der Gesamtmenge von 3 ccm einen Komplementverbrauch von $^1/_{40}$ ccm, bei 6 ccm Gesamtmenge von $^1/_{20}$ ccm Komplement und bei 12 ccm einen Komplementverbrauch von $^1/_{50}$ ccm. Dieselben Verhältnisse ergaben sich auch bei Verwendung von 3 und 6 Ambozeptoreinheiten. Scheller gab auch an, daß, wenn hie und da der Komplementverbrauch nicht völlig den richtigen Verhältnissen entspreche, so sei dies auf die Wirkung der Normalambozeptoren in den Meerschweinchenseren zurückzuführen. Das Ergebnis faßte Scheller folgendermaßen zusammen: Bei gleichem Immunkörpergehalt ist zur Lösung der gleichen Menge roter Blutkörperchen stets dieselbe Komplementkonzentration notwendig; das Komplement wirkt also nicht nach seiner absoluten Menge, sondern nur nach der Stärke seiner Konzentration. Scheller konnte daher die Angaben von Kiß nach dieser Richtung bestätigen. Anderseits prüfte Scheller den Ambozeptorverbrauch in verschiedenen Flüssigkeitsmengen bei gleichbleibendem Komplementüberschuß. Hiebei wurde gefunden, daß der Immunkörper (Hbl.-Ambozeptor) unabhängig von seinem Verdünnungsgrade proportional seiner Menge bei gleicher Konzentration des Komplements wirke.

Den genaueren Nachweis für diese Beziehung hatte jedoch bereits ein Jahr vorher (1909) Noda[1]) erbracht. Zwei Versuchsserien sind nach dieser Richtung angeführt. In einer Serie wirkten auf die Erythrozyten Immunserumlösungen gleicher Konzentration in allmählich zunehmender Menge. Es wurden von einer Verdünnung des Immunserums von 1 : 50000 aufsteigend 0,2, 0,4,

1) l. c.

0,6, 0,8 und 1 ccm genommen. Entsprechend dieser Konzentrationszunahme des Immunserums war auch der Lösungseffekt für die gleiche Erythrozytenmenge ein in derselben arithmetischen Reihe ansteigender. Die Differenz zwischen dem beobachteten Lösungseffekt, bestimmt nach dem Hämoglobinometer und der berechneten Lyse war sehr gering. In einer zweiten Serie wirkten auf die Erythrozyten Immunserumlösungen von allmählich abnehmender Konzentration in allmählich steigender Menge. Eine Reihe von Versuchen war mit 0,2 ccm einer Immunserumlösung von 1 : 10000 beschickt, die nächste mit 0,4 in einer Verdünnung von 1 : 20000, die dritte von 0,6 mit einer Verdünnung von 1 : 30000, die vierte mit 0,8 einer Verdünnung von 1 : 40000, und schließlich die fünfte mit einer Verdünnung von 1 : 50000 des Immunserums. Entsprechend diesen verringerten Mengen an Immunserum bei gleicher Erythrozytenmenge und gleicher Menge an Aktivserum verminderte sich der Lösungseffekt genau nach den absteigenden Zahlen der Immunserumverdünnungen. Noda folgerte aus diesen Versuchsergebnissen: Der Sensibilisierungseffekt bzw. der Lösungseffekt ist unabhängig von der Konzentration des Immunserums und proportional der in der sensibilisierenden Lösung enthaltenen Gesamtmengen an Immunkörper. Streng genommen sind die Versuchsergebnisse von Scheller nach dieser Richtung nur Bestätigungen der Angaben von Noda und weiters Bestätigungen der Angaben von Kiß hinsichtlich der Wirkung des Aktivserums (Komplements) nach der Konzentration. In der Folge wurden diese Befunde von Kiß und Noda bzw. deren Wiederholung von Scheller auch noch von anderer Seite geprüft. Liefmann und Cohn[1]) und Liefmann und Andreew[2]) fanden im allgemeinen, daß das Komplement in größere Verdünnung schlechter wirke, konnten aber nicht so regelmäßige Verhältnisse wie Kiß und Noda bzw. später Scheller nachweisen.

Eingehend befaßten sich auch Ungermann und Kandiba[3])

---

1) Z. f. Imm. Orig.-Bd. 8, 1911, S. 58.
2) Z. f. Imm. Orig.-Bd. 11, 1911, S. 355.
3) Arb. a. d. kais. Gesundheitsamt, 40. Bd., 1912, S. 24.

mit dem Mechanismus der Komplement- und Ambozeptorwirkung. Ungermann und Kandiba suchten hiebei durch Versuche gleich die Frage zu lösen, ob die antibakteriellen Immunkörper im gleichen Sinne wirken wie die hämolytischen. Die beiden Autoren gelangten ebenfalls zu der Ansicht, daß die hämolytischen Antikörper in vitro nach der absoluten Menge wirken, das Komplement dagegen vorwiegend nach der Verdünnung. Die phagozytären Antikörper, die Tropine, scheinen sich grundsätzlich ebenso zu verhalten wie die hämolytischen Antikörper. Schlemmer[1]) studierte nach dieser Richtung eingehend das Verhalten der bakteriolytischen Komplemente und gelangte ebenfalls zu der Überzeugung, daß diese wie die hämolytischen nicht nach den absoluten Mengen, sondern annähernd nach dem Grade der Verdünnungen wirken. Zum Unterschied von den anderen Forschern fand jedoch Schlemmer, daß das Immunserum im bakteriziden Plattenversuch nicht nach seiner absoluten Menge, sondern ebenfalls annähernd nach dem Grade seiner Verdünnung seine Tätigkeit entfalte.

Eine eingehende Kritik dieser Ergebnisse, namentlich der Angaben von Scheller finden wir wieder bei Leschly[2]). In seinen zahlreichen Versuchsreihen gibt Leschly zunächst eine Übersicht über Komplementtiter in dem Gesamtvolumen von 1,25, 2,5, 5 und 10 ccm bei Verwendung eines zweifachen Ambozeptortiters und 0,5 ccm einer 5proz. Hbl.-Aufschwemmung. Als Mittelwerte ergaben sich für die Bestimmungen an 20 Komplementseren für das Volumen 1,25 ccm ein mittlerer Komplementbedarf von 0,021 ccm (unverdünnt), für die Gesamtmenge von 2,5 ccm ein Komplementbedarf von ebenfalls 0,021 ccm, für das Volumen von 5 ccm hingegen ein Komplementbedarf von 0,031 ccm und für 10 ccm ein Komplementbedarf von 0,053 ccm. Leschly fand, daß von irgendeiner Proportionalität nach diesen Ergebnissen keine Rede sein könne, zumindest die Unterschiede nicht so hochgradig seien, wie sie Scheller angibt. Er fand in Ergänzung dieser Untersuchungen, daß die Unterschiede bei den verschieden

1) Arb. a. d. kais. Gesundheitsamt, 50. Bd., 3. H., 1916, S. 341.
2) l. c.

großen Flüssigkeitsmengen noch kleiner werden, wenn man größere Ambozeptormengen als 2 Einheiten verwendet. So wurde in den 4 verschiedenen Flüssigkeitsmengen bei Verwendung von 5 Ambozeptoreinheiten ein Komplementverbrauch von 0,016, 0,016, 0,016 und 0,03 ccm gefunden. Anderseits wies jedoch Leschly nach, daß die schlechtere Wirkung des Komplements bei größeren Verdünnungen einer herabgeminderten Reaktionsgeschwindigkeit zu verdanken sei. In größeren Voluminis wird die hämolytische Wirkung des Komplements durch Verwendung größerer Ambozeptormengen wesentlich vermehrt. Die Unterschiede jener Ambozeptorüberschüsse sind daher verständlich. Um weitere Beziehungen der Reaktionsgeschwindigkeit zur Konzentration des Komplements festzustellen, ermittelte Leschly durch besondere Versuche, daß bei gleichen Komplementkonzentrationen die Hämolyse auch mit gleicher Geschwindigkeit verläuft. Die durch die Verdünnung eingetretene Abschwächung des Komplementes ist der Verdünnung proportional.

Die Bedeutung der Frage des Einflusses der Flüssigkeitsmenge auf das Verhalten von Komplement und Ambozeptor bei der Hämolyse gab die Veranlassung zu eigenen Versuchen. Es sollte der Verbrauch verschiedener frischer Meerschweinchenseren bei Verwendung verschieden zahlreicher Ambozeptoreinheiten in verschiedener Flüssigkeitsmenge, jedoch bei einer Versuchsreihe *A* nur bei ½stündiger Einwirkung im Brutschrank und weiter 1½stündiger Einwirkung bei gewöhnlicher Temperatur und in einer weiteren Versuchsreihe *B* bei 2stündiger Einwirkung im Brutschrank geprüft werden. Es war anzunehmen, daß bei größeren Flüssigkeitsvolumen die Einwirkungstemperatur und deren Dauer von Einfluß sein müsse.

Versuch A. Ambozeptortiter bei bestimmtem Komplementüberschuß: 0,001; 0,5 ccm einer 5proz. Hbl.-Aufschwemmung 3 Meerschweinchensera, Die Komplementauswertung ergab bei 4fachem Ambozeptortiter für

Meerschweinchenserum I einen Komplementverbrauch von 0,1 ccm (1:10 red.)
» II » » » 0,1 ccm (1:10 »)
» III » » » 0,1 ccm (1:10 »)

Der Komplementverbrauch war daher bei allen 3 Sera gleich hoch. Hbl. wurde stets vor Komplementzusatz ½ Stunde bei Bruttemperatur sensibilisiert.

Versuch A.

Komplementtiter bei 2 Ambozeptoreinheiten.

Meerschweinchenserum	Nach ½ Stunde bei 37°				Nach 1 weiteren Stunde bei Zimmertemperatur				Nach 1½ Stunden bei Zimmertemperatur			
	in Volumen von											
	1,25 ccm	2,5 ccm	5 ccm	10 ccm	1,25 ccm	2,5 ccm	5 ccm	10 ccm	1,25 ccm	2,5 ccm	5 ccm	10 ccm
I	0,18	—	—	—	0,12	0,14	0,25	0,4	0,12	0,14	0,25	0,35
II	0,18	—	—	—	0,12	0,14	0,2	0,4	0,12	0,14	0,2	0,4
III	0,18	—	—	—	0,14	0,16	0,25	0,4	0,14	0,14	0,2	0,4

Komplementtiter bei 4 Ambozeptoreinheiten.

Meerschweinchenserum	1,25 ccm	2,5 ccm	5 ccm	10 ccm	1,25 ccm	2,5 ccm	5 ccm	10 ccm	1,25 ccm	2,5 ccm	5 ccm	10 ccm
I	0,16	0,18	0,2	0,4	0,12	0,12	0,18	0,3	0,1	0,1	0,16	0,25
II	0,12	0,16	0,2	0,35	0,1	0,12	0,16	0,25	0,1	0,1	0,14	0,25
III	0,14	0,16	0,25	0,4	0,12	0,12	0,18	0,3	0,1	0,1	0,16	0,25

Nach ½ Stunde im Brutschrank konnte bei den gewählten Komplementabstufungen in keinem Volumen eine Lösung erreicht werden. Nach einer weiteren Stunde bei Zimmertemperatur ergaben sich für 2 Ambozeptoreinheiten Abstufungen im Komplementbedarf entsprechend dem verschieden großen Gesamtvolumen, die sich in der folgenden halben Stunde kaum mehr veränderten. Auffallend sind hiebei die nahezu gleichen Werte für das Volumen von 1,25 wie für das von 2,5 ccm trotz Verdoppelung der Menge. Im Volumen 5 ccm ist der Komplementbedarf nur im Mittel etwa 50 Proz. erhöht und im Volumen 10 ccm gegenüber 5 ccm in 2 Fällen verdoppelt und in einem Falle um die Hälfte höher.

Ähnliche Unterschiede zeigen sich auch bei Verwendung von 4 Ambozeptoreinheiten. Auch hier fällt in allen 3 Rubriken die fast vollständige Gleichheit der Verbrauchswerte für die Mengen 1,25 und 2,5 ccm auf. Für das Volumen von 5 und 10 ccm sind die Verbrauchswerte wieder erhöht um etwa 50 Proz. bei 5 und um etwa 75 Proz. beim Volumen 10 ccm. Die Werte sind im all-

gemeinen niedriger als bei Verwendung von 2 Ambozeptoreinheiten. Als Ergebnis dieser Versuchsreihe kann gesagt werden, daß bei dieser Einwirkungsart der Komplementverbrauch sich nicht proportional der Flüssigkeitszunahme erhöht, daß aber eine beträchtliche Steigerung des Bedarfs erkennbar ist und zwar für 2 Ambozeptoreinheiten und 4 Einheiten etwa in dem Umfange, wie dies auch Leschly finden konnte.

Welche Unterschiede bietet nun die Versuchsreihe B.

Versuch B.

Komplementtiter bei 2 Ambozeptoreinheiten.

Meerschweinchenserum	Nach $1/2$ Stunde bei 37°				Nach 2 Stunden bei 37°				Nach 2 Stunden bei 37° u. 16 St. bei gew. Temp.			
	in Volumen von											
	2,5 ccm	5 ccm	7,5 ccm	10 ccm	2,5 ccm	5 ccm	7,5 ccm	10 ccm	2,5 ccm	5 ccm	7,5 ccm	10 ccm
I	—	—	—	—	0,2	0,3	0,35	0,4	0,2	0,25	0,35	0,35
II	—	—	—	—	0,3	0,4	—	0,4	0,3	0,35	0,45	0,4

Komplementtiter bei 8 Ambozeptoreinheiten.

Meerschweinchenserum	2,5 ccm	5 ccm	7,5 ccm	10 ccm	2,5 ccm	5 ccm	7,5 ccm	10 ccm	2,5 ccm	5 ccm	7,5 ccm	10 ccm
I	0,08	0,15	0,2	0,2	0,06	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
II	0,15	0,2	0,35	0,9	0,08	0,08	0,15	0,1	0,08	0,08	0,1	0,1

In Übereinstimmung mit dem Versuch A sind die Bedarfswerte bei Verwendung von 2 und 8 Ambozeptoreinheiten im allgemeinen verschieden, bei 2 Einheiten wesentlich höher als bei 8. Die Komplementauswertung ergab bei 4fachem Ambozeptor einen Bedarf von 0,1 bei Serum I und 0,2 ccm Serum II. Deshalb ist es verständlich, wenn im Volumen 2,5 ccm bei 2 Ambozeptoreinheiten die Werte höher, bei 8 Einheiten niedriger liegen.

Wichtiger jedoch ist die Wahrnehmung, daß nach 2stündigem Verweilen im Brutschrank bei 2 Ambozeptoreinheiten die Bedarfswerte mit den Voluminis steigen, bei 8 Einheiten jedoch so gut wie nicht erhöht sind.

Von einer Abhängigkeit der Lyse von der Konzentration des Komplements kann bei dieser Einwirkungsart keine Rede sein,

die absolute Menge ist allein maßgebend. Die Ursache dieses Unterschiedes liegt wohl in der zeitlichen Ungleichheit der Erwärmung der einzelnen Flüssigkeitsmengen — bei nur ½stündiger Einwirkung bei Bruttemperatur tritt bei größerem Volumen eine Reaktionsverzögerung ein, bei 2stündigem Verweilen ist die Reaktion fast völlig beendet, wie dies auch die Befunde nach 16 Stunden beweisen.

Auch diese Versuchsergebnisse können die Angaben Schellers nicht bestätigen, bedeuten vielmehr eine Bestätigung der Auffassung von Leschly. Auch ergibt sich aus den Versuchen in Übereinstimmung mit Leschly, daß in größeren Voluminis die hämolytische Wirkung des Komplements durch Verwendung größerer Ambozeptormengen erhöht ist. Eine Schwächung des Komplements durch 2stündiges Stehen bei Bruttemperatur und in hochgradiger Verdünnung scheint nach Versuch B nicht eingetreten zu sein.

Es erübrigt noch die Prüfung der Angabe von Scheller, daß der Immunkörper unabhängig von seinem Verdünnungsgrade proportional seiner Menge bei gleicher Konzentration des Komplements wirke. Der folgende Versuch gibt darüber Aufschluß: Resultat der Auswertung von 3 frischen Meerschweinchensera bei 4Ambozeptoreinheiten: für I 0,15, für II 0,2, für III 0,2 ccm in Verdünnung 1 : 10. Komplementmenge für den Versuch 0,5 ccm jedes Serums, Ambozeptorverdünnungen von 2 Immunseren, 0,5proz. Hbl.-Aufschwemmung, Sensibilisierung des Hbl. mit Ambozeptorverdünnung, Gesamtmenge abgestuft von 1,5 bis 10 ccm (siehe Tabelle S. 32).

Im allgemeinen fällt zunächst auf, daß die Unterschiede im Präparinbedarf bei den verschiedenen Flüssigkeitsmengen während der kurzen Einwirkungszeit von ½ Stunde am größten sind — vom Volumen 1,5 ccm zum Volume 10 ccm ist in einem Falle eine Verdreifachung, in einem Falle eine Verdoppelung und in drei Fällen eine Erhöhung des Immunserumbedarfs um 20 bis 60 Proz. eingetreten. Nach einer Einwirkung von 2 und noch mehr von weiteren 14 Stunden bewegt sich der Mehrverbrauch an Immunserum vom Volumen 1,5 zum Volumen 10 ccm nur mehr

Ambozeptor	Meerschweinchenserum	Nach 1/2 Stunde bei 37° im Volumen				Nach 2 Stunden bei 37°				Nach weiteren 14 Stunden bei Zimmertemperatur			
		1,5 ccm	2,5 ccm	5 ccm	10 ccm	1,5 ccm	2,5 ccm	5 ccm	10 ccm	1,5 ccm	2,5 ccm	5 ccm	10 ccm
A	I	0,0013	0,004	0,004	0,004	0,0008	0,0008	0,002	0,002	0,0008	0,0008	0,0013	0,0013
	II	0,002	0,002	0,004	—	0,001	0,0013	0,0013	0,002	0,0013	0,0013	0,0013	0,002
	III	0,002	0,004	0,004	0,004	0,0013	0,0013	0,002	0,004	0,0013	0,0013	0,002	0,002
B	I	0,0006	0,0007	0,0007	0,0007	0,0004	0,0005	0,0006	0,0007	0,0004	0,00045	0,0006	0,0006
	II	0,0005	0,0006	0,0006	0,0007	0,00035	0,00045	0,0004	0,0005	0,00045	0,00045	0,00045	0,0005
	III	0,0004	0,0006	0,0006	0,0007	0,0004	0,00045	0,00045	0,00045	0,0004	0,00045	0,00045	0,00045

zwischen 10 und 60 Proz. Ob dieser geringe Mehrverbrauch auf Schwächung des Komplements oder des Ambozeptors infolge hochgradiger Verdünnung oder auf andere Reaktionsverzögerungen zurückzuführen ist, erscheint fraglich. Sicher jedoch ist, daß der Ambozeptor auch bei hochgradigen Verdünnungen proportional seiner absoluten Menge wirkt. Sowohl Komplement als Ambozeptor wirken daher nicht nach der Konzentration, sondern lediglich nach der absoluten Menge.

C. Gesetzmäfsigkeit in den Beziehungen zwischen Aktivserum und inaktiviertem Immunserum.

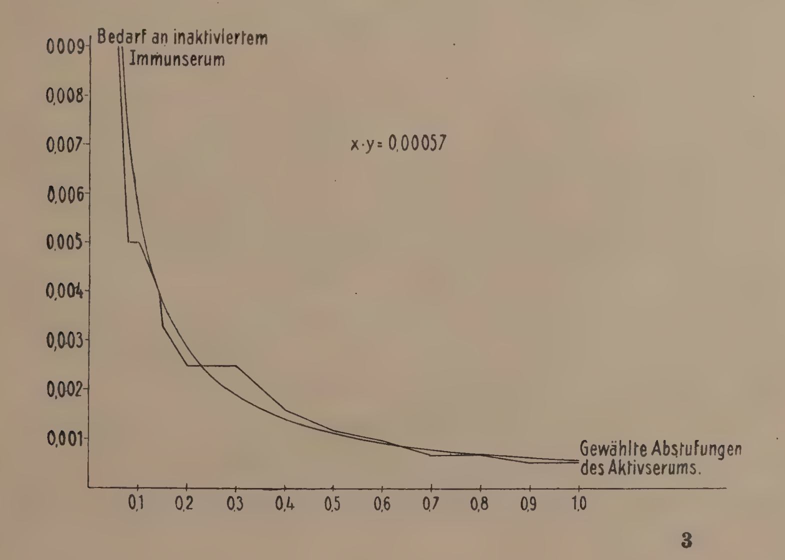
Die vorigen Versuche mit verschiedenen Komplement- und Ambozeptorüberschüssen haben bereits eine Gesetzmäßigkeit im Verhalten dieser beiden Agentien ahnen lassen. Einmal auf dieser Fährte wurden immer ausgedehntere Versuche angestellt, um durch weitere Abstufungen des Komplements und Ambozeptors innerhalb des hämolytischen Systems den Charakter dieser Gesetzmäßigkeit zu erkennen. So wurden z. B. immer für die gleiche Erythrozytenmenge von 0,5 ccm einer 5proz. Aufschwemmung folgende Abstufungen des Aktivserums der Verd. 1:10 gewählt:

1,5, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,25, 0,2, 0,15, 0,1, 0,08, 0,05, 0,02 ccm. Es ergab sich hiebei, daß zur vollständigen Hämolyse nach 2stündigem Verweilen bei 37° in derselben Reihenfolge erforderlich waren:

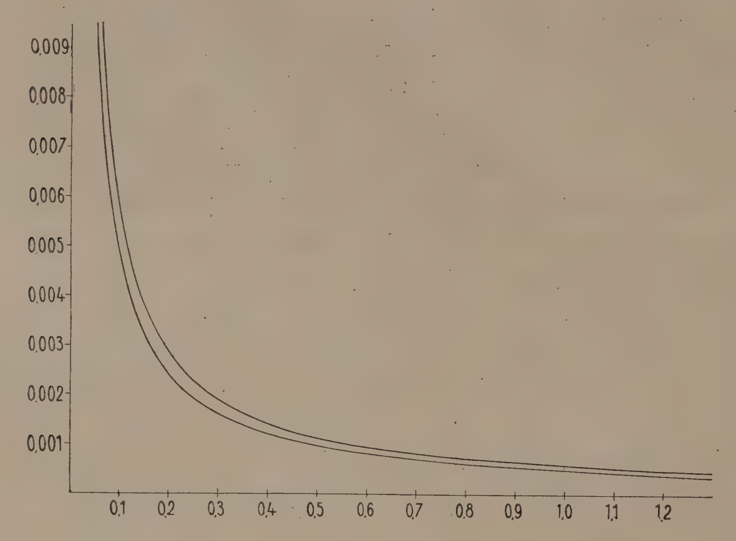
0,00055, 0,00055, 0,00055, 0,0007, 0,0007, 0,001, 0,0012, 0,0016, 0,0025, 0,0025, 0,0025, 0,0033, 0,005, 0,005, 0,001 und 0,05 Immunserum.

Werden diese Werte, und zwar die gewählten Abstufungen des Aktivserums auf die Abszissenachse, die Bedarfszahlen an inaktiviertem Immunserum auf die Ordinatenachse eines Koordinatensystems aufgetragen, so gibt die Verbindungslinie der einzelnen Punkte ein Gebilde, das mit einer Kurve Ähnlichkeit hat.

Tatsächlich ließ sich berechnen, daß die Produkte der Aktiv- und Immunserumwerte mit 0,00057 eine konstante Zahl geben und daß mit entsprechender Korrektur der kleinen Versuchsfehler die einzelnen Punkte eine gleichseitige Hyperbel ergaben. Die ermittelten Punkte und die mathematische Kurve sind in der nächsten Tafel eingezeichnet. Die Versuchswerte fallen mit hinreichender Genauigkeit in die mathematische Kurve. In zwei andern Versuchsreihen ähnlicher Art, auch wieder mit gewählten Abstufungen des Aktivserums, wurden nach den gefundenen Versuchswerten die beiden Kurven berechnet, deren konstanter Faktor ähnliche Werte wie früher aufwies. Die beiden in der nächsten Tafel gebrachten Kurven sind auch wieder gleichseitige Hyperbelkurven.



Ähnliche Ergebnisse wurden auch gefunden bei weitgehend gewählten Abstufungen des Immunserums und Feststellungen des Komplementbedarfs nach den verschiedenen Einwirkungszeiten.

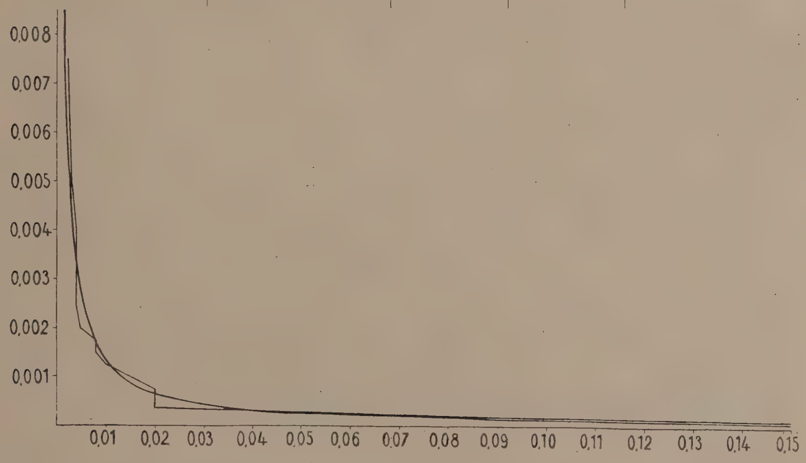


Wir bringen hier der Vollständigkeit halber in einer Übersicht diese Abstufungen des Immunserums und den ermittelten Komplementbedarf nach den einzelnen Einwirkungszeiten (siehe Tabelle S. 35).

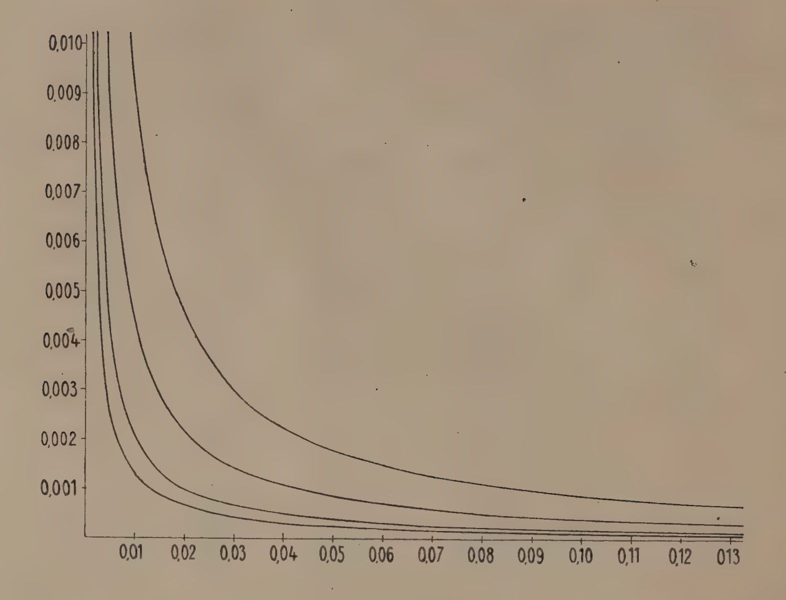
Die Ergebnisse nach 2 Stunden Bruttemperatur und nach weiteren 20 Stunden bei Zimmertemperatur sind nahezu völlig gleich, und auch die Werte nach einem ½stündigem Verweilen und 2stündigen Verweilen bei Bruttemperatur sind nur in bestimmten Abschnitten der Einwirkung in höherem Grade voneinander verschieden. Werden die Werte nach zweistündigen Verweilen bei Bruttemperatur wieder auf den Koordinatenachsen aufgetragen, so ergibt sich wieder das Bild einer Hyperbelkurve, die in nachstehender Tafel zur Darstellung gebracht ist.

Hier wurde als konstanter Faktor gefunden $= 0{,}00013$, also ein niedrigerer Faktor als bei den früheren mit gewählten Abstufungen von Aktivserum. Die mathematische Kurve ist auch wieder

Gewählte Ambozeptor-Abstufungen		Komplementbedarf		
		1/2 Std.	2 Std.	20 Std.
1/4 fach	0,000060	üb. 0,4	0,300	0,3000
½ »	0,000125	» 0,3	0,150	0,1500
¾ »	0,000190	» 0,2	0,080	0,0800
1 »	0,000250	» 0,1	0,050	0,0500
1½ »	0,000380	0,035	0,020	0,0200
2 »	0,000500	0,030	0,020	0,0200
3 »	0,000750	0,020	0,020	0,0200
4 »	0,001000	0,020	0,015	0,0150
5 »	0,001250	0,020	0,010	0,0100
6 »	0,001500	0,010	0,008	0,0080
7 »	0,001750	0,010	0,008	0,0080
8 »	0,002000	0,008	0,005	0,0050
10 »	0,002500	0,008	0,004	0,0040
12 »	0,003000	0,010	0,004	0,0040
16 »	0,004000	0,006	0,005	0,0040
20 »	0,005000	0,005	0,003	0,0030
30 »	0,007500	0,005	0,003	0,0025



eine gleichseitige Hyperbel. Versuche ähnlicher Art wurden in großer Zahl ausgeführt, und stets ergab sich dasselbe Resultat — eine gleichseitige Hyperbel. In der folgenden Tabelle sind Grenzwerte zwischen Minimum und Maximum der gefundenen Konstanten für die gleichseitige Hyperbel und noch zwei dazwischenliegende Werte in den mathematischen Kurven gebracht.



Nach diesen Versuchsergebnissen ist eine Gesetzmäßigkeit in den Beziehungen zwischen Alexin und Präparin unleugbar vorhanden. Alle Kurven bieten das Bild einer gleichseitigen Hyperbel, die Konstanten sind einfach das Produkt der korrespondierende Werten von Alexin und Präparin. Jetzt sind auch die verschiedenen Befunde der einzelnen Forscher hinsichtlich des Verhältnisses zwischen Alexin und Präparin erklärlich. Nach der Charakteristik der gleichseitigen Hyperbel muß von einem bestimmten Präparinüberschuß an ein annähernd gleichbleibender Alexinbedarf gefunden werden. Die Kurventangenten nähern sich allmählich den Hyperbelasymptoten, welche im vorliegenden Falle durch die Koordinatenachsen dargestellt sind. Mathematisch genommen, nimmt natürlich der Alexinbedarf bei steigenden Präparinüberschüssen allmählich ab, aber praktisch genommen sind diese Alexinwerte annähernd konstant. Anderseits ist bei Verwendung starker Alexinüberschüsse wieder der Präparinverbrauch fast gleichbleibend, da der andere Ast der Kurve sich ebenfalls nur allmählich der zweiten Asymptote nähert. In bestimmten Abschnitten der gleichseitigen Hyperbel sind die Befunde von Thomsen und Leschly insoweit richtig, als bei stets steigenden

Präparinüberschüssen doch der Alexinbedarf annähernd derselbe bleibt. Die Rechteckflächen, die für die einzelnen Hyperbelkurven durch Senkrechte von den betreffenden Kurvenpunkten auf die beiden Asymptoten begrenzt werden, weisen stets denselben Flächeninhalt auf. An einem Punkt der Hyperbelkurve wird das Rechteck ein Quadrat; mit der Annäherung an die Asymptoten werden die Rechtecke immer schmäler, die eine Seite kann theoretisch unendlich werden, während die andere Seite dann sehr klein oder Null wird. Für die Versuchstechnik sind jedoch bestimmte Grenzen gesetzt.

Die meisten Versuche wurden mit dem System-Hammelblut-Antiserum, Hbl. und Meerschweinchenserum angestellt; einige Versuche jedoch auch mit dem System-Rinderblut-Antiserum, gewaschene Rinderblutkörperchen und Meerschweinchenserum vorgenommen. Die Gesetzmäßigkeit blieb bei beiden Systemen dieselbe, stets fielen die gefundenen Werte in die Linie einer gleichseitigen Hyperbel. Die ermittelten Konstanten bildeten für 14 Versuche folgende Werte: Minimum 0,00002, 0,00004, 0,000044, 0,000056, 0,000089, 0,00009, 0,00013, 0,00013, 0,0003, 0,0003, 0,00035, 0,00035, 0,00048 und 0,00057 als Maximum[1]). Es ist von vorneherein anzunehmen, daß diese Konstanten von der jeweiligen Resistenz der Blutkörperchen, vom Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit und vielleicht auch von anderen Faktoren abhängig sein werden.

Die eingangs besprochenen Versuchsergebnisse von Morgenroth und Sachs können nunmehr viel einfacher gedeutet werden. Zu deren Verständnis seien ziffernmäßig die Werte einer Versuchsreihe für den Komplementbedarf der Verdünnung 1:10 bei weitgehenden Abstufungen des Immunserums nach zweistündiger

---

1) Die ersten Kurven wurden noch im k. k. Hauptquartier von Herrn Hofrat Artur Linninger berechnet; die späteren Kurven verdanken wir der freundlichen Mitwirkung des Herrn Professors Dr. Karl Döhlemann der Technischen Hochschule, unter dessen Leitung der Assistent für höhere Mathematik Herr Meierhöfer die Berechnungen und Zeichnungen ausgeführt hat. Allen Herren sei auch an dieser Stelle für die Unterstützung herzlichst gedankt.

Einwirkung bei Verwendung von 0,5 ccm einer 5 proz. Hbl.-Aufschwemmung wiedergegeben.

a) Abstufungen des Immunserums	Verhältniszahlen für a)	b) Komplementbedarf	Verhältniszahlen für b)
0,00025	1	1,2 ccm	1
0,0005	2	0,65 »	$^1/_2$
0,00075	3	0,45 »	$^1/_3$
0,001	4	0,35 »	$^1/_4$
0,0015	6	0,2 »	$^1/_6$
0,002	8	0,1 »	$^1/_{12}$
0,003	12	0,06 »	$^1/_{20}$
0,004	16	0,06 »	$^1/_{20}$
0,008	32	0,04 »	$^1/_{30}$
0,012	48	0,04 »	$^1/_{30}$
0,02	80	0,04 »	$^1/_{30}$

Morgenroth und Sachs fanden bei Erhöhung der Ambozeptormengen um das 4-, 8- und 20 fache eine verschiedene Verminderung des Komplementbedarfs um das 6- bis 20 fache. Diese Unterschiede sind nach der Entwicklung der Verhältniszahlen für die beiden Agentien verständlich. Ist der Ausgangswert für das Immunserum ein sehr niedriger — nicht nur absolut, sondern auch nach seinem Sensibilisierungsvermögen —, so ist der Komplementbedarf recht bedeutend und bei Steigerung der Mengen an Immunserum auf den 20 fachen Wert und darüber kann der Komplementbedarf auf $^1/_{20}$ ja sogar auf $^1/_{30}$ verringert werden. Bis zu welchem Bruchteil der Komplementbedarf verringert werden kann, kommt lediglich auf den Ausgangspunkt der Menge an Immunserum an. Je nachdem wird bis zum Eintritt der annähernden Konstanz die Verringerung des Komplementbedarfs $^1/_6$ oder $^1/_{20}$ der Ausgangsmenge betragen können. Ist der Ausgangspunkt — wie bei den Versuchen von Morgenroth und Sachs mit Ochsenblut — nahe an der Konstanz für den Komplementbedarf bei entsprechend hohem Sensibilisierungsvermögen des Immunserums, so ist die Verminderung der Alexinmenge trotz namhafter Steigerung der Immunserummenge nur mehr unbedeutend und bald ist, wie dies Morgenroth und Sachs auch wahrnehmen konnten, eine annähernde Konstanz des Alexinbedarfs erreicht. In Kenntnis der Gesetzmäßigkeit der Beziehungen zwischen Präparin und Alexin

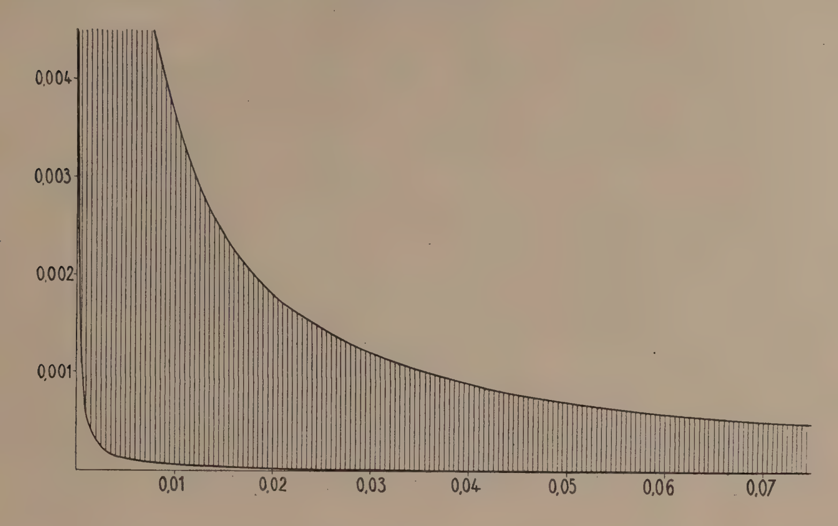
macht daher die richtige Deutung der vorbesprochenen Unterschiede keine Schwierigkeiten. Es erscheint überflüssig, mit der Annahme von Partialambozeptoren und verschieden dominanten Komplementen der Sera diese einfachen gesetzmäßigen Beziehungen erklären zu wollen. Weiters ist mit den gesetzmäßigen Beziehungen zwischen Präparin und Alexin auch verständlich gemacht, weshalb bei den Versuchen mit steigenden Erythrozytenmengen und einem in gleicher Weise steigenden Überschuß an Präparin der Alexinbedarf annähernd der gleiche blieb. Bei bestimmten gleichen Überschüssen an Präparin und zwar in Mengen, die für eine mittlere Beizung der gesteigerten Mengen von Blutkörperchen genügten, ist eben nur eine Mindestmenge an Alexin erforderlich, die nach dem Hyperbelcharakter nur wenig von der Blutkörperchenmenge abhängig zu sein braucht.

Eine besondere Eigentümlichkeit der gefundenen Wechselbeziehung liegt in der Reaktionsgeschwindigkeit und Lösungsbreite. Wir haben in vielen Versuchen nicht nur den Zustand der völligen Hämolyse nach verschiedenen Einwirkungszeiten ermittelt, sondern auch den Lösungseffekt bis zum Aufhören jeder Einwirkung kolormetrisch verfolgt. In der nächsten Tabelle sind für ein Beispiel die einzelnen Werte für die gewählten Abstufungen an Immunserum und die verschiedenen Komplementmengen unverdünnt je nach dem Lösungszustand zur Darstellung gebracht. Noch besser wird das Ergebnis die nächste Tafel zur Darstellung bringen. Es ergibt sich aus diesem Befunde, daß mit steigenden Mengen anImmunserum die Lösungsbreite immer geringer wird, immer kleinere Mengen von Alexin genügen, um die komplette Hämolyse herbeizuführen. Und wie wir seinerzeit hervorgehoben haben, tritt auch die Hämolyse bei diesen Überschüssen an Immunserum mit steigender Schnelligkeit ein. Geradezu entgegengesetzt ist das Verhalten bei großen Alexinmengen und geringen Zugaben an Immunserum. Auch die größte Menge Alexin vermag allein eine Hämolyse nicht zustande zu bringen. Auch hier ist eine bestimmte kleine Menge an Immunkörper erforderlich. Die Lösungsbreite hingegen wird in diesem Abschnitt mit zunehmender Alexinmenge immer größer und größer. Nur bei den größten Mengen von

Mengen an Immunserum.

Komplement-Abstufungen	$^1/_4$ 0,000125	$^1/_2$ 0,00025	$^3/_4$ 0,000375	1 0,0005	$1^1/_2$ 0,00075	2 0,001	3 0,0015	4 0,002	5 0,0025	6 0,003	7 0,0035	8 0,004	10 0,005	12 0,006	16 0,008
0,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,3	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,2	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,15	95	**100**	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,1	95	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,08	95	95	**100**	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,06	—	—	98	**100**	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,05	90	90	—	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,04	85	85	95	98	**100**	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,035	—	—	—	95	—	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,03	80	80	90	95	98	**100**	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,025	—	—	—	95	—	—	**100**	**100**	100	100	100	100	100	100	100
0,02	75	80	80	90	95	95	98	98	**100**	100	100	100	100	100	100
0,015	—	—	—	85	95	—	98	95	98	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**
0,01	65	60	75	80	90	90	95	95	98	95	95	95	95	95	95
0,008	50	50	70	70	85	85	95	90	95	95	95	95	95	95	95
0,006	—	—	—	—	80	80	90	—	95	95	95	95	95	95	90
0,005	30	30	35	55	70	75	85	90	95	95	90	90	90	90	—
0,004	20	25	25	45	60	70	80	85	90	90	85	90	85	90	85
0,003	18	20	15	30	50	55	70	75	80	90	80	85	80	—	80
0,0025	15	15	12	—	35	45	60	65	70	80	70	80	70	80	70
0,002	10	10	10	15	20	30	50	50	55	60	60	70	60	60	60
0,0015	0	0	5	10	10	20	30	35	35	40	40	40	40	30	45
0,001	—	—	0	0	0	10	10	15	15	15	20	20	20	15	20
0,0008	—	—	—	—	—	0	—	10	5	5	5	10	10	10	10
0,0006	—	—	—	—	—	—	—	0	0	0	0	5	5	5	5
0,0004	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	0	0

Alexin tritt völlige Hämolyse ein, ein geringerer Lösungseffekt jedoch ist auch bei den kleineren Alexinmengen und kleinen Mengen an Immunkörpern festzustellen, bis endlich keine Einwirkung auf die Blutkörperchen wahrzunehmen ist.



Wir wollen schließlich noch in ähnlicher Weise, wie dies von Morgenroth und Sachs[1]) für verschiedenartige Hämolyseversuche geschehen ist, für einen Versuch in einer Tabelle die komplett und eben nicht mehr lösenden Alexinmengen und deren Verhältnis zueinander bringen, wobei wir bemerken, daß Morgenroth und Sachs im Mittel von 13 Kombinationen ein Verhältnis von 100 zu 13,6 bzw. 14,1 gefunden hatten (siehe Tabelle S. 42).

Unsere Verhältniszahl ist im Mittel etwa 100 : 5 und schwankt von 100 : 1,9 bis zu 100 : 8.

Die Tatsache, das sich das Verhältnis der Mengen von Präparin (Immunserum) und Alexin, welche zur kompletten Hämolyse bestimmter Blutarten innerhalb einer bestimmten Frist erforderlich sind, durch eine gleichseitige Hyperbel darstellen läßt, oder mit andern Worten, daß das Produkt der zusammengehörigen Mengen der beiden Stoffe eine Konstante ist, ist sehr bemerkens-

1) l. c.

Abstufungen des Immunserums		Komplett lösende Alexinmenge 1	Eben nicht mehr lösende Alexinmenge 2	Unterschiedswert 1	Bruchteil 2 von 1
¼ fach	0,0005	0,150	—	—	—
½ »	0,0010	0,080	0,0015	9,0785	1,9 %
¾ »	0,0015	0,060	0,0015	0,0485	2,5 »
1 »	0,0020	0,035	0,0015	0,0235	4,3 »
1½ »	0,0030	0,030	0,0010	0,0290	3,3 »
2 »	0,0040	0,025	0,0010	0,0240	4,0 »
3 »	0,0060	0,020	0,0008	0,0192	4,0 »
4 »	0,0080	0,020	0,0008	0,0192	4,0 »
5 »	0,0100	0,015	0,0008	0,0142	5,3 »
6 »	0,0120	0,015	0,0008	0,0142	5,3 »
7 »	0,0140	0,015	0,0008	0,0142	5,3 »
8 »	0,0160	0,015	0,0008	0,0142	5,3 »
10 »	0,0200	0,015	0,0008	0,0142	5,3 »
12 »	0,0240	0,015	0,0008	0,0142	5,3 »
16 »	0,0320	0,015	0,0008	0,0142	5,3 »
20 »	0,0400	0,010	0,0008	0,0092	8,0 »
30 »	0,0600	0,010	0,0008	0,0092	8,0 »
50 »	0,1000	0,010	0,0008	0,0092	8,0 »

wert. Diese Tatsache scheint alle Theorien der Hämolyse, welche die Bildung eines Hämolysins, einer chemischen Verbindung zwischen Präparin und Alexin (Ambozeptor und Komplement), sei es schon im Blutplasma (Ehrlich), sei es erst innerhalb der Erythrozyten (Arrhenius), annehmen, zu widerlegen. Sie läßt u. E. keine andere Erklärung zu, als daß jeder der beiden Stoffe für sich auf das Stroma der Erythrozyten einwirkt und nun ihre Wirkungen sich ergänzen. Das Alexin kann aber allerdings erst dann von den Erythrozyten aufgenommen werden und damit zur Wirkung kommen, wenn eine gewisse Menge von Präparin adsorbiert worden ist und ihm gewissermaßen den Weg in das Stroma gebahnt hat. (Bordet, Gruber.) Schon eine äußerst geringe Menge von Präparin genügt dazu. Je mehr Präparin adsorbiert worden ist, um so stärker ist die Permeabilität der trennenden Schichten verändert. Von dem Grade dieser Veränderung hängt die Menge Alexin ab, welche erforderlich ist, um das Hämoglobin zum Austritt zu bringen. Vielleicht darf man sich vor-

stellen, daß die Menge des aufgenommenen Präparins die Maschenweite des Stromafilters bestimmt — die Permeabilität der Membran der Erythrozyten ist proportional der aufgenommenen Menge Antiserum (Bordet) — während das Alexin die elektrische Ladung des Stromas verändert, wie es von Michaelis und Takahashi[1]) angenommen wird. Je weniger die Durchlässigkeit der Membran erhöht ist, um so ausgiebiger muß die elektrische Umladung des Stromas sein, um trotz des Widerstandes das Hämoglobin zum Austritt zu bringen.

Mit unserer Auffassung, daß beide Stoffe unmittelbar auf das Stroma einwirken und sich nur in ihren Wirkungen ergänzen, scheint auch die Tatsache gut vereinbar zu sein, daß — wie unsere Versuche lehren — bei einem bestimmten Grade der Präparierung der Erythrozyten durch Immunserum die zur kompletten Hämolyse erforderliche Zeitdauer der angewandeten Alexinmenge umgekehrt proportional ist, d. h. das Verhältnis von Zeit und Alexinmenge ebenfalls durch eine gleichmäßige Hyperbel ausgedrückt werden kann.

Viel umstritten ist auch die Frage, ob dem Alexin (Komplement) Fermentcharakter zukomme. Bekanntlich stellten Ehrlich und Morgenroth die Hypothese auf, daß Ambozeptor und Komplement sich zu Lysin verbinden. Trotz der Annahme einer chemischen Verbindung betrachtete Ehrlich das Alexin als ein proteolytisches Enzym, also als ein Ferment, das die Zellen verdaut und löst (zymotoxische Gruppe). In den letzten Jahren hat man den Nachweis des Fermentcharakters des Alexins in zweierlei Richtung versucht: einmal durch den vermeintlichen Zusammenhang zwischen Wirkung und Konzentration bei der Komplementbindung, und weiter durch die Erörterung der Frage, ob bei der eigentlichen Hämolyse ein Komplementverbrauch stattfindet. Die Frage, ob für den Alexinbedarf die Konzentration oder die absolute Menge maßgebend ist, wurde bereits eingehend erörtert. Die Annahme von Kiß[2]) und Scheller[3]), daß die Konzentration

---

1) Bioch. Ztschr. Bd. 29, 1910.

2) Z. f. Imm. Bd. 3, 1909. — 3) l. c.

maßgebend sei, hat sich als unrichtig erwiesen. Mit dieser Frage im Zusammenhang steht auch die Erörterung, ob bei hinreichender Konzentration die lösbare Blutmenge unbeschränkt sei oder nicht. Auch diese Frage ist, nachdem der gesetzmäßige Charakter der Beziehungen erkannt ist, leicht zu beantworten; wir haben bereits darauf hingewiesen. Die Versuchsresultate von Kiß nach dieser Richtung sind allerdings recht verwirrend. Kiß verwendete 0,04 ccm Komplement, um eine Bluteinheit (0,5 ccm Blut), die mit der einfachen Ambozeptordosis beladen war, in einem Volumen von 5 ccm zu hämolysieren. Bei diesem Mengenverhältnis trat eine völlige Hämolyse nicht ein. Er steigerte nun die Bluteinheiten und verwendete offenbar für die Sensibilisierung die entsprechenden größeren Mengen von Ambozeptor (nicht deutlich angegeben). Bei dieser Anordnung trat bei Verwendung von 1 Bluteinheit keine völlige Hämolyse ein, nur 80 Proz. waren gelöst, bei 6 Einheiten 50 Proz., bei 25 Einheiten 30 Proz. und bei 100 Einheiten waren nur etwa 10 Proz. gelöst. Wurde nur etwas mehr Komplement für die einzelnen Blutkörpercheneinheiten verwendet (0,05 ccm), so wurden die ersten 4 Bluteinheiten völlig hämolysiert, bei 6 Einheiten waren 80 Proz., bei 12 etwa 70 Proz. hämolysiert, bei 50 20 Proz. und bei 100 Einheiten 15 Proz. Nach diesen Resultaten folgerte hauptsächlich Kiß, daß der Grad der Hämolyse innerhalb weiter Grenzen von der absoluten Menge des Komplements unabhängig ist, und daß daher das Komplement als Katalysator wirke. Nach unseren Erfahrungen ist auch hier die Deutung einfach. Bei der ersten Versuchsanordnung war der Komplementzusatz überhaupt ungenügend. Da aber die Sensibilisierung bei den einzelnen Bluteinheiten eine ziemlich weitgehende war, konnte mit der unzureichenden Alexinmenge doch ein weitgehender Lösungseffekt erreicht werden, der nur allmählich mit dem steigenden Mißverhältnis zwischen Ambozeptormenge und verfügbarer Alexinmenge abnahm. Bei der zweiten Versuchsanordnung trat genau dieselbe Regelmäßigkeit ein, nur mit dem Unterschiede, daß bei den ersten Bluteinheiten eine völlige Hämolyse — bewirkt durch die etwas größere Alexinmenge — sich zeigte, während für die weitern Bluteinheiten in ähnlichem Verhältnis

wie vorher eine Abnahme des Hämolysengrades bemerkbar war.

Ein weiteres Argument für den Fermentcharakter des Alexins nahm Kiß in der starken Beeinflussung der Komplementwirkung durch die Kochsalzkonzentration an. Auch diese Versuche von Kiß, die wir nur bestätigen können, sind ganz anders zu deuten. Bei schwächeren Kochsalzkonzentrationen ist entsprechend den geänderten Diffusionsverhältnissen eine geringere Sensibilisierung notwendig, und auch eine geringere Alexinmenge, um Hämolyse herbeizuführen. Wird jedoch für eine gegebene Erythrozytenmenge dieselbe Menge an Immunserum verwendet wie bei höherer Kochsalzkonzentration, so ist der Komplementbedarf ein geringerer; das Umgekehrte tritt hinsichtlich des Ambozeptorverbrauchs und des Komplementbedarfs bei hypertonischen Aufschwemmungsflüssigkeiten ein. Hier ist der Ambozeptorbedarf infolge Überwindung des stärkeren Membrantonus zur Erreichung eines gleichen Sensibilisierungsgrades größer und entsprechend auch der Bedarf an Alexin. Wird jedoch für die Sensibilisierung die gleiche Ambozeptormenge genommen wie bei physiologischer Kochsalzlösung, so sind sehr gesteigerte Alexinmengen erforderlich, um doch noch eine völlige Hämolyse zustande zu bringen.

Schließlich glaubte auch Kiß den Fermentcharakter des Alexin aus dem Grunde annehmen zu müssen, da es keine Anhaltspunkte für eine chemische Bindung zwischen Ambozeptor und Komplement gäbe. Diese letztere Vermutung ist zwar richtig, nur kann man aus der Verneinung einer chemischen Verbindung nicht auf den Fermentcharakter schließen. Im Gegenteil, gerade die Versuche von Kiß lassen bereits die Beziehung zwischen Ambozeptorverbrauch und Komplementbedarf klar erkennen, aber statt diese Wechselbeziehungen weiter zu verfolgen, um einen gesetzmäßigen Charakter zu finden, verfiel Kiß in den Fehler, sich namentlich durch den Befund gleichen Komplementbedarfs bei hochgesteigerten Erythrozytenmengen zur Annahme des Katalysatorcharakters des Alexins verleiten zu lassen.

Ergebnisse für das hämolytische System.

a) Ambozeptorbedarf bei steigenden Erythrozytenmengen und gleichbleibender überschüssiger Komplementmenge:

Bei steigenden Mengen von Blutkörperchen (0,5 ccm einer 2,5proz., 5proz., 7,5proz. und 10proz. Hbl.-Aufschwemmung) ist in demselben Verhältnis eine steigende Menge von Immunserum zur Hämolyse bei gleichbleibender überschüssiger Komplementserummenge erforderlich; Blutkörperchenmenge und Ambozeptorbedarf gehen proportional. (Übereinstimmung mit einem Nebenbefund von Leschly[1]).

b) Komplementbedarf bei steigenden Erythrozytenmengen und gleichbleibender Ambozeptormenge:

Der Komplementbedarf ist ungeachtet steigender Blutkörperchenmengen (wie vorher) bei gleichbleibender überschüssiger Immunserummenge ein annähernd gleich großer. (Bestätigung der Angabe von Scheller[1]): dieselbe Komplementmenge kann bei Ambozeptorüberschuß sehr verschieden große Erythrozytenmengen lösen; Gegensatz zu Leschly: die zur vollen Lyse einer bestimmten Blutkörperchenmenge notwendige Komplementmenge kann nur ein wenig größere Blutmengen, maximal die doppelte Menge komplett lösen.)

c) Komplementbedarf bei gleicher Erythrozytenmenge und steigenden Ambozeptormengen:

Für die vollständige Lösung derselben Erythrozytenmenge (0,5 ccm einer 5proz. Blutkörperchenaufschwemmung) ist der Komplementbedarf bei Verwendung der einfachen Ambozeptormenge wesentlich höher als bei Verwendung der 2- und 3fachen Menge. Größere Ambozeptorüberschüsse von der 4fachen bis zur 20fachen Menge vermindern den Komplementbedarf nicht merklich. Die Geschwindigkeit der Lyse wächst mit steigenden Ambozeptorüberschüssen, bedeutendere Unterschiede treten jedoch nur bis zur 4- bis 6fachen Menge hervor. (Gegensatz zu den Angaben von Morgenroth und Sachs[1]), Noguchi[1]), Scheller u. a., wonach Änderungen der Ambozeptormenge ohne Gesetzmäßigkeit den Komplementbedarf beeinflussen; teilweise Übereinstimmung mit

1) l. c.

Thomsen[1]) und Leschly, die angeben, daß der Komplementbedarf bei Verwendung der 1- bis 32fachen Ambozeptormenge stets derselbe und nur die Geschwindigkeit der Lyse verschieden ist.

d) Gesetzmäßigkeit in den Beziehungen zwischen Komplement und Ambozeptor:

Wiederholte Versuche mit weitgehenden Abstufungen der Komplement- und Ambozeptormengen ergaben gesetzmäßige Beziehungen zwischen den jeweiligen Bedarfsmengen, die sich durch eine gleichseitige Hyperbelkurve darstellen lassen. Die Widersprüche in den Angaben der einzelnen Autoren werden dadurch aufgeklärt. Wie die Senkrechten, die von einem beliebigen Punkte der Hyperbelkurve auf die beiden Asymptoten gezogen werden, stets in reziprokem Verhältnisse stehen, so daß sie stets eine gleich große Rechteckfläche abgrenzen, so ist eine völlige Reziprozität zwischen dem Komplement- und Ambozeptorbedarf vorhanden. Es wird nur bald die Annäherung der Kurve an die Asymptote nach jeder der beiden Seiten hin so groß, daß bei steigenden Überschüssen des Komplements bzw. des Ambozeptors das zur totalen Hämolyse der Blutkörperchen erforderliche Minimum des reziproken Faktors fast konstant wird. Von der etwa 4- bis 6fachen Ambozeptormenge an ist dieses fast konstante Minimum an Komplementbedarf erreicht, das gleiche gilt vice versa vom Komplementüberschuß und Ambozeptorminimum. Für die einzelnen Komplementsera und Immunsera ist der Verlauf der Kurve verschieden, der gesetzmäßige Grundcharakter der Beziehungen zwischen Komplement und Ambozeptor ist jedoch stets vorhanden.

e) Abhängigkeit des Komplementtiters bei verschiedenen Ambozeptorüberschüssen und gleicher Erythrozytenmenge vom Gesamtflüssigkeitsvolumen:

Bei einem bestimmten Ambozeptorüberschuß ist für die Lösung der gleichen Erythrozytenmenge bei verschieden großem Flüssigkeitsvolumen (1,25, 2,5, 5 und 10 ccm) stets die gleiche absolute Menge von Komplement erforderlich. Das Komplement wirkt daher nur nach seiner absoluten Menge, nicht nach der Stärke seiner Konzentration. (Gegensatz zu Kiß und Scheller: Kom-

1) l. c.

plement wirkt nach der Stärke seiner Konzentration; Übereinstimmung mit Leschly.)

f) Abhängigkeit des Ambozeptorbedarfs bei gleichem Komplementüberschuß und gleicher Erythrozytenmenge vom Gesamtflüssigkeitsvolumen:

Auch der Ambozeptor wirkt proportional seiner absoluten Menge selbst bei hochgradigen Verdünnungen, d. h. es wird unabhängig vom Flüssigkeitsvolumen stets die gleiche absolute Menge Ambozeptor gebraucht. (Übereinstimmung mit Leschly, Gegensatz zu Scheller: ein gleicher Ambozeptorbedarf in verschiedenen Flüssigkeitsmengen kann nur bei derselben Komplementkonzentration erreicht werden.)

g) Einfluß der Normalambozeptoren auf die Beziehungen zwischen Komplement und Ambozeptor:

Auf die gesetzmäßigen quantitativen Beziehungen zwischen Komplement und Ambozeptor hat der Gehalt des Meerschweinchenserums oder anderer Sera an Normalambozeptoren keinen merklichen Einfluß. (Zum Teil in Übereinstimmung mit Leschly.)

h) Spielt das Komplement im hämolytischen System die Rille eines Katalysators?

Die nachgewiesenen gesetzmäßigen Beziehungen zwischen Komplement und Ambozeptor widersprechen der Annahme von der Fermentnatur des Komplements. (Gegensatz zu Kiß, Scheller u. a.)

II. Verschiedene Methoden und die eigene Methode.

A. Verschiedene Methoden.

Bekanntlich besteht das Wesen der Seroreaktion bei Syphilis, wie überhaupt die Verwendung der Komplementbindung für diagnostische Zwecke darin, daß bei der Vereinigung der in einem Serum enthaltenen spezifischen Stoffe mit einem Antigen (bakterielle Antigene oder Organextrakte) das Alexin (Komplement) gebunden wird und nun nicht mehr für das hämolytische System zur Verfügung steht. Eine genaue Abgrenzung der Menge an Alexin (Komplement), die für die Ergänzung des hämolytischen

Systems gerade erforderlich ist, kann als wichtigste Forderung bezeichnet werden. Aus diesem Grunde haben wir im vorigen Abschnitt die quantitativen Beziehungen der einzelnen Agentien des hämolytischen Systems so eingehend betrachtet. Die Bedeutung der gefundenen Gesetzmäßigkeit wird später Erörterung finden. Vorerst müssen wir uns mit den verschiedenen Methoden der Komplementbindung für die Serodiagnostik der Syphilis befassen. Auch die Besprechung der Eigentümlichkeiten des Extraktes und des Patientenserums wollen wir später einflechten.

Von den einzelnen Methoden steht die Originalmethode von Wassermann im Vordergrunde. Für die Kriegszeit hat diese Methode trotz vielfacher Angriffe noch an Bedeutung gewonnen durch eine Verfügung des preußischen Kriegsministeriums, nach der in allen Heeresuntersuchungsstellen die Original-Wassermann-Methode anzuwenden ist. Bei diesem Anlasse wurde hervorgehoben, daß nach den bisherigen Erfahrungen diese Methode vor allen andern Verfahren den Vorzug verdiene, da sie am ehesten zu zweifelsfreien, überall vergleichbaren Ergebnissen führe. Behufs Erleichterung der Durchführung an den einzelnen Untersuchungsstellen werden von der Kaiser-Wilhelms-Akademie für das militärische Bildungswesen genau geprüfte spezifische Extrakte (Antigene) und inaktivierte Hbl. lösende Sera abgegeben, deren Herstellung unter Leitung von Wassermann im Kaiser-Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie erfolgt. Nur Komplement (Alexin) und Hbl.-Körperchen sind bei den Untersuchungsstellen selbst zu gewinnen. Die Patientensera werden nunmehr statt wie gewöhnlich ½ Stunde eine volle Stunde im Wasserbade auf 55° C erwärmt. Gründe für diese Vorschrift sind nicht bekanntgegeben. Für jeden Versuch ist zunächst ein hämolytischer Vorversuch anzusetzen und die Brauchbarkeit der Hbl.-Körperchen zu prüfen. Für den Vorversuch wie für den Hauptversuch werden die einzelnen Agentien auf 0,5 ccm aufgefüllt und als Gesamtvolumen stets die Menge von 2,5 ccm erreicht. Sorgfältig gewaschene und wieder auf die Blutmarke aufgefüllte Hbl.-Körperchen werden in einer Verdünnung von 1 : 20 und zwar 0,5 ccm verwendet, vom Komplement (Alexin) werden stets von der Verdünnung

1 : 10 auch 0,5 ccm genommen und die Auffüllung geschieht durch physiologische Kochsalzlösung. Für den hämolytischen Vorversuch werden unter Berücksichtigung der auf einem Fläschchen angegebenen Titerdosis entsprechende Verdünnungen hergestellt und nach Zusatz der anderen Agentien die Röhrchen 2 Stunden im Brutschrank oder 1 Stunde im Wasserbade bei 37° C gehalten. Als kleinste lösende Dosis (Titerdosis) wird die Verdünnung betrachtet, in der gerade noch völlige Lösung der Blutkörperchen eingetreten ist Gleichzeitig werden die roten Blutkörperchen durch Komplementzusatz ohne Immunserum auf ihre Brauchbarkeit geprüft, d. h. in diesem Falle dürfen sie weder durch die Kochsalzlösung noch durch den Alexinzusatz irgendwie gelöst werden. Als Gebrauchsdosis für den Hauptversuch dient die 4fache Titerdosis des Immunserums auf Grund der Feststellung im Vorversuche. Eine besondere Bestimmung des Komplementtiters erfolgt nach der Originalvorschrift im Vorversuch nicht. Ob der Alexin-Komplementüberschuß mit 0,5 ccm der Verdünnung 1 : 10 größer oder kleiner ist, findet somit keine Berücksichtigung. Die Gebrauchsdosis für die spezifischen Extrakte, von denen stets 2 zu verwenden sind, ist auf dem Fläschchen angegeben. Fortlaufende Feststellungen der sog. „alleinhemmenden Dosis“ sind nicht vorgeschrieben.

Im Hauptversuch werden vom Menschenserum nur 2 Röhrchen mit den beiden Antigenen angesetzt. Zunächst werden 0,1 ccm des Menschenserums und zwar 0,5 ccm in der Verdünnung 1 : 5 mit 0,5 ccm des Extraktes und 0,5 ccm des Komplements in der Verdünnung 1 : 10 gemischt und diese Mischung zwecks Bindung 1 Stunde bei 37 C° gehalten. Dann erfolgt der Zusatz der 4fachen Titermenge des hämolytischen Ambozeptors und der Hbl.-Körperchenaufschwemmung. Alle Röhrchen kommen nach kräftigem Durchschütteln wiederum in den Brutschrank oder in das Wasserbad. An Kontrollen werden bei der Originalmethode stets verwendet je 1 Antigenkontrolle mit beiden Extrakten (ohne Menschenserum), 1 sicher positives und 1 sicher negatives Serum mit beiden Extrakten, ferner an Serumkontrollen das Krankenserum mit 1 ccm der Verdünnung 1 : 10 (also die doppelte

Versuchsmenge) und das negative und positive Vergleichsserum auch in doppelter Menge (diese 3 Serumkontrollen ohne Extrakt). Jedes einzelne Krankenserum beansprucht daher bei Einrechnung aller Kontrollen 11 Röhrchen, nach Abzug der für eine Serienreihe gemeinsamen Kontrollen mindestens 3 Röhrchen. Im Verlaufe der Reaktion wird bei den einzelnen Röhrchen der Zeitpunkt festgestellt, an dem die Extrakt- und Serumkontrollen völlig gelöst sind. Von diesem Zeitpunkt an werden die Röhrchen noch 1 Stunde im Brutschrank oder im Wasserbade gelassen, und dann zur endgültigen Feststellung der Untersuchungsergebnisse herausgenommen. Der Ausfall der Reaktion wird nach der Originalmethode mit Kreuzen bezeichnet, und zwar: keine Lösung der Blutkörperchen mit ××××, nur schwache Lösung der Blutkörperchen mit ×××, teilweise Lösung der Blutkörperchen (¼ der Menge etwa) mit ×× (sog. große Kuppe), Lösung der Blutkörperchen zu mehr als einer Hälfte mit + — (sog. kleine Kuppe) und — mit völliger Lösung der Blutkörperchen. Nach der Vorschrift von Wassermann dürfen bei Erstuntersuchungen nur Sera als positiv bezeichnet werden, welche mit allen Antigenen eine völlige Hemmung der Hämolyse ergeben haben, also ein Resultat mit ×××× bzw. ×××. Resultate mit großer Kuppe (××) und weniger werden bei Erstuntersuchungen als zweifelhaft bezeichnet und nur dann als positiv, wenn das Bestehen von Syphilis früher einmal einwandfrei nachgewiesen wurde. Nach der ursprünglichen Vorschrift war für alle Reagentien die doppelte Menge, d. h. statt 0,5 ccm 1 ccm vorgeschrieben und als Gesamtmenge 5 ccm; aus Rücksicht für den großen Verbrauch an Reagentien werden nunmehr als Gesamtmenge 2,5 ccm gewählt.

Frankfurter Methode (nach Sachs).

Diese Methode unterscheidet sich im wesentlichen von der Originalmethode durch Verwendung von unspezifischen Extrakten und fortlaufenden Extraktprüfungen auf Alleinhemmung. Nach der Beschreibung von Pöhlmann[1]) werden Rinderherzextrakte

1) Die Technik der Wassermannschen Reaktion, München 1917, Müller & Steinicke.

mit Cholesterin und auch reine alkoholische Rinderherz- oder Meerschweinchenextrakte verwendet. Für die Extraktprüfungen werden abgestufte Mengen der Verdünnungen (mit Kochsalzlösung 1 : 4) von 1 ccm, 0,8 ccm, 0,6 ccm, 0,4 ccm, 0,2 und 0,1 ccm mit 0,5 ccm Kochsalzlösung versetzt, gemischt und 1¼ Stunde in den Brutschrank gegeben. Nach dieser Zeit werden entweder 0,5 ccm einer 5 proz. Hbl.-Körperchenaufschwemmung und 0,5 ccm der 3- bis 4 fachen Ambozeptortiterdosis getrennt oder nach vorheriger Vereinigung (Sensibilisierung) zugefügt.

Ferner wird regelmäßig der Ambozeptor (Präparin) in gewöhnlicher Weise ausgewertet. Auch hier kommen 0,5 ccm des Komplements in Verdünnung 1 : 10, die gleichen Mengen einer 5 proz. Hbl.-Körperchenaufschwemmung mit den entsprechenden Ambozeptorverdünnungen zur Verwendung. Die Ablesung der Resultate erfolgt bei der Ambozeptorauswertung bereits nach ½ bis ¾ Stunden; das Röhrchen mit der letzten vollständigen Lösung der Blutkörperchen zeigt die Ambozeptoreinheit an.

Hauptversuch: Wie bei der Extraktauswertung, so wird auch beim Hauptversuch die 3- bis 4 fache Ambozeptortiterdosis verwendet. Die Mengenverteilung ist, wie bei der Originalmethode, für alle Reagentien 0,5 ccm, die Gesamtmenge stets 2,5 ccm. Doch wird das Patientenserum in der 10 fachen Verdünnung genommen, so daß in 0,5 ccm nur 0,05 ccm Serum enthalten ist. Die Einwirkung von Extrakt und Serum auf Komplement in der Menge von 1,5 ccm erfolgt innerhalb 1½ Stunden im Brutschrank. Nach Zusatz von Ambozeptor (Präparin) und Hbl.-Körperchen, getrennt oder nach vorheriger Mischung verbleiben die Röhrchen 2 Stunden im Brutschrank, um sodann das erste Mal abgelesen zu werden; das definitive Resultat wird erst am nächsten Morgen nach Verweilen im Eisschrank oder Frigoapparat bestimmt. An Kontrollen werden wieder Extraktabstufungen ohne Serum, ferner eine Serumkontrolle mit einfacher Dosis, also 0,05 ccm ohne Extrakt, und schließlich eine Kontrolle mit sicher positivem und sicher negativem Serum vorgenommen.

Die Ablesung der Resultate erfolgt in recht komplizierter Weise nach folgenden Bezeichnungen:

O = komplette Hemmung der Hämolyse
Sp = Spur Hämolyse
W = wenig Hämolyse
alle 3 Unterscheidungen als positive Reaktion
M = mäßige Hämolyse
als zweifelhafte Reaktion
St = starke Hämolyse
Fc = fast komplette Hämolyse
C = komplette Hämolyse
alle 3 Unterscheidungen als negative Reaktion

Methode nach Sonntag[1]).

Auch für diese Methode ist die Gesamtmenge 2,5 ccm, der Erythrozytenanteil mit 0,5 ccm der 5proz. Aufschwemmung 1 Proz. Die Ambozeptor- (Präparin-) Auswertung im Vorversuch wird wie bei den vorherigen Methoden mit 0,5 ccm des 10fachen verdünnten Alexins vorgenommen; die Ablesung erfolgt hingegen nach 1stündigem Aufenthalt im Brutschrank; als Gebrauchsdosis wir der 5fache Titer genommen. Zum Unterschiede von den beiden früheren Methoden wird hier auch eine besondere Feststellung des Alexin (Komplement-)Titers durch Abstufungen des Alexins und Ablesen des Resultates ebenfalls nach 1 Stunde Brutschrank vorgenommen. Als Besonderheit folgen noch weitere Alexintiterbestimmungen mit den einzelnen zum Gebrauch bestimmten Extrakten und gegebenenfalls auch mit einem positiven und einem negativen Serum. Es wird jedoch nicht die derart gewonnene Grenzdosis an Alexin für den Hauptversuch gewählt, sondern eine mehrfache Menge, die zumeist 0,5 ccm der 10fachen Verdünnung wie bei den anderen Methoden beträgt. Für den Hauptversuch finden alkoholische Luesextrakte und auch unspezifische Ätherextrakte und zwar in abgestuften Mengen (meist 5 Abstufungen) Verwendung; vom Patientenserum wird im allgemeinen 0,1 ccm genommen, zur Kontrolle nach der alten Vorschrift auch die doppelte Menge mit 0,2 ccm. Extrakt, Patienten-

1) Die Wassermannsche Reaktion in ihrer serologischen Technik und klinischen Bedeutung, Berlin 1917, J. Springer.

serum und Alexin können aufeinander ½ bis 1 Stunde bei Bruttemperatur einwirken, sodann erfolgt der Zusatz der zumeist ¼ Stunde sensibilisierten Blutkörperchen. Die erste Ablesung erfolgt nach 1stündigem Verweilen bei Bruttemperatur und einem Stehenlassen von ¼ Stunde bei Zimmertemperatur, die zweite definitive Ablesung wird am nächsten Morgen nach Verweilen im Eisschrank oder auch im Versuchszimmer vorgenommen. An Kontrollen werden die gewöhnlichen Extrakt-, Serum- und Systemkontrollen beobachtet und, wie bei der Originalmethode, beim Versuch auch ein bekannt positives und negatives Serum verwendet.

Wie aus den Extraktabstufungen ersichtlich, soll durch dieselben eine quantitative Auswertung der einzelnen Sera erreicht werden. Die Zahl der Röhrchen ist dementsprechend ohne Kontrollen mindestens 7. Hinsichtlich der Beurteilung des Versuchsergebnisses wird unterschieden: + als komplette Hemmung, ± oder ∓ als inkomplette Hemmung und — als Hämolyse, daher negative Reaktion. Die Ausdehnung der positiven Reaktion wird nach dem Fehlen der Hämolyse bei den verschiedenen Extraktabstufungen mit + bis 0,1, ++ bis 0,05 ccm Extrakt usw. gekennzeichnet.

Methode von Boas.[1])

Eine wesentlichere Änderung weist die folgende Methode von Boas auf. Für diese Methode wird als Gesamtmenge 5 ccm gewählt, dementsprechend ist jedoch auch der Erythrozytenzusatz 1 ccm einer 5proz. Aufschwemmung, so daß die Aufschwemmungsdichte wieder 1 Proz. beträgt. Für die Austitrierung des Ambozeptors (Präparins) wird in analoger Erhöhung 1 ccm des 10fachen verdünnten Alexins zugegeben. Die Ablesung erfolgt nach 2stündigem Verweilen im Brutschrank; als Gebrauchsdosis wird der 2½fache Titer gewählt. Boas arbeitet grundsätzlich nur mit unspezifischen Extrakten. Bei der Alexinauswertung bestimmt er ähnlich, wie bei der Methode von Sonntag, zunächst den Alexintiter nach 2stündigem Verweilen im Brutschrank und sodann nochmals genauer nach Zusatz von 0,2 ccm des unspezifischen Extraktes.

1) Die Wassermannsche Reaktion, S. Karger, Berlin 1914.

Für das hämolytische System werden bei Verwendung der doppelt so großen Hbl.-Menge gewöhnlich 0,5 ccm des 10fachen Meerschweinchenserums als die kleinste totallösende Dosis gebraucht; diese Menge wird auch zur Serumkontrolle verwendet. Nach Zusatz von Extrakt ist der Alexintiter zumeist auf 0,8 ccm erhöht. Diese Dosis findet für den Hauptversuch Verwendung. Für diesen ist eine quantitative Auswertung der einzelnen Sera durch Serumabstufungen charakteristisch, gewöhnlich in folgenden Mengen: 0,2 ccm, 0,1 ccm, 0,05 ccm, 0,025 ccm und 0,01 ccm. Die 5 Röhrchen mit den entsprechenden Extrakt- und Alexinmengen bleiben zunächst ¾ Stunden bei Laboratoriumstemperatur stehen und werden sodann noch ¾ Stunden behufs gegenseitigen Einwirkens in den Brutschrank gestellt. Hernach werden die Präparin- und Erythrozytenmengen für sich hinzugefügt. Die Röhrchen bleiben 2 Stunden bei Bruttemperatur und dann nachts über im Eisschrank; die Ablesung erfolgt erst am nächsten Morgen mit Hilfe einer Hämoglobinskala, wie sie von Madsen angegeben wurde. Jedes Serum, welches mit 0,2 ccm nach der Hämoglobinskala eine Hämolysezahl zwischen 70 bis 100 ergibt, also völlige oder fast völlige Auflösung der Erythrozyten zeigt, wird als negativ bezeichnet, die Sera mit Hämolysezahlen von 60 abwärts als positiv.

Methode von Sormani.

Von den Inaktivmethoden sei schließlich noch die Methode von Sormani[1]) erwähnt. Gesamtmenge und Erythrozytendichte sind die gleichen wie bei den früheren Methoden; als Ambozeptor-(Präparin-)dosis wird jedoch der 8- bis 12fache Titer genommen, die Alexinauswertung findet ebenfalls mit und ohne Zusatz von Extrakt statt; als Gebrauchsdosis wird der mit dem Extrakt gefundene Titer gewählt; doch erfolgt die Ablesung bereits nach ½stündigem Verweilen im Brutschrank. In Übereinstimmung mit der Methode von Sonntag wählt auch Sormani 5 Extraktabstufungen, die Patientenserummenge ist auf 0,2 ccm erhöht, zum Extrakt-Serum-Komplementgemisch werden 1 Stunde hindurch sensibilisierte Hbl.-Körperchen hinzugefügt. Das Re-

1) Z. f. I. Bd. XI, 1911.

sultat wird ebenfalls nach einem ½stündigen Verweilen bei Bruttemperatur abgelesen. Als Kontrollen kommen zur Verwendung: ein positives und ein negatives Serum, eine Serumkontrolle mit gewöhnlicher Menge, jedoch mit dem Komplementtiter ohne Extrakt, ferner eine Extraktkontrolle in 5 Abstufungen.

Mit dieser Aufzählung der einzelnen Methoden sind nur die bekannteren kurz geschildert. Andere, seltenere Methoden werden später im Zusammenhang noch besprochen.

Methode von Müller-Landsteiner.[1])

Von den Methoden mit Verwendung eines nicht inaktivierten Serums scheint die von Müller-Landsteiner die größte Verbreitung zu besitzen. Müller-Landsteiner bevorzugt grundsätzlich die Tropftechnik, während bei allen andern Methoden ausschließlich die Pipette zur Verwendung kommt. So werden für die Auswertung des hämolytischen Ambozeptor (Präparins) als Basis 50 Tropfen Kochsalzlösung (2½ ccm) genommen, und je 1 Tropfen der verschiedenen Ambozeptorverdünnungen, 1 Tropfen Komplement und 1 Tropfen Schafblut der 50proz. Aufschwemmung zugegeben. Die Gesamtmenge beträgt daher bei dieser Auswertung 2,65 ccm; die Ablesung erfolgt nach ½stündigem Verweilen im Brutofen. Für den Hauptversuch wird der 3fache Titer genommen. Eine besondere Alexinauswertung findet wie bei der Originalmethode nicht statt. Für den Hauptversuch sind im allgemeinen die Mengenverhältnisse dieselben, nur kommen noch hinzu je 4 bzw. 5 und 6 Tropfen eines gewöhnlichen und eines besonders zubereiteten alkoholischen Rinderherzextraktes und außerdem 1 Tropfen Patientenserum, so daß die Gesamtmenge nach Zusatz von je 1 Tropfen hämolytischen Serums mit dem 3fachen Titer und 1 Tropfen 50proz. Schafblutes mindestens 3,05 ccm mit 4 Extrakttropfen und höchstens 3,15 mit 6 Extrakttropfen beträgt. In einzelnen Fällen werden auch Röhrchen mit 1 bis 3 Tropfen Extrakt beschickt. In diesen Fällen ist die Gesamtmenge auf 2,9 bzw. 3,0 ccm vermindert. Das Extrakt-Serum-Alexin-Kochsalzgemisch kommt behufs gegenseitiger Einwirkung auf 1 Stunde in den

---

1) Die Serodiagnose der Syphilis, Urban u. Schwarzenberg, Wien 1913.

Brutofen, nach dem getrennten Zusatz des hämolytischen Serums und des Schafblutes werden die Röhrchen gewöhnlich nur ½ Stunde in den Brutschrank gegeben; dann erfolgt die erste Ablesung, die zweite ½ bis ¾ Stunden später bei Zimmertemperatur. An Kontrollen sind vorgesehen: eine gewöhnliche Serumkontrolle und außerdem auch eine ansteigende Extraktkontrolle mit 10 bis 30 Tropfen, so daß in diesen Fällen die Gesamtmenge bis zu 4,15 ccm ansteigt. Die Bezeichnung der Resultate erfolgt nach 7 Graden und zwar:

××××× = komplett positiv
×××× = fast komplett positiv
××× = über mittelstark positiv
×× = mittelstark positiv
× = schwach positiv
S = spurpositiv
— = negativ.

Nur diejenigen Sera werden als positiv bezeichnet, die wenigstens im Röhrchen mit 5 Tropfen Extrakt auch bei der zweiten Ablesung komplett positive Reaktion zeigen. Negativ ist ein Serum, das bei der ersten Ablesung auch mit der höchsten Extraktdosis keine Spur ungelöstes Blut konstatieren ließ. Die übrigen Ergebnisse werden als inkomplett bezeichnet und deren Untersuchung wiederholt. Auch Sera mit Eigenhemmung werden nochmals geprüft.

Methode von Noguchi.

Zur Ergänzung erwähnen wir noch die Methode Noguchi[1]). Noguchi verwendet antimenschliches Kaninchenserum, der Titer dieses Serums wird mit 0,1 ccm Meerschweinchenserum in der Verdünnung 1 : 5 bestimmt. Zur Verwendung gelangen als Gebrauchsdosis 2 Ambozeptoreinheiten. Die Menschenblutaufschwemmung ist auch stets 1 prozentig. Für den Hauptversuch wird sowohl inaktiviertes als aktives Patientenserum verwendet. Als Extrakt bringt Noguchi bei Aktivserum ein besonders präpariertes proteinfreies lipoides Antigen zur Anwendung. Bei Aktivserum nimmt Noguchi 0,02 ccm, bei Inaktivserum 0,08 ccm.

1) Z. f. I. Bd. VII, 1910.

Der Alexinzusatz beträgt 0,1 ccm, in der Verdünnung 1 : 2½. Serumkomplement und Antigengemisch werden auf 1 Stunde im Brutschrank zusammengebracht und nach Zusatz von 1 ccm der 1 proz. Blutkörperchenaufschwemmung, die mit der 2fachen Ambozeptordosis sensibilisiert sind, gelangen die Röhrchen auf weitere 2 Stunden in den Brutschrank.

Außer diesen Methoden mit Aktivserum gibt es noch eine Reihe anderer, wie die Methode von Bauer, bei der statt des hämolytischen Immunserums die im Patientenserum vorhandenen Normalpräparine verwendet werden, oder die Methode von Hecht, der außer den Normalpräparinen auch das Eigenalexin heranzieht. Auch wären in diesem Zusammenhang zu erwähnen die von Weidan-Engel, Halle und Pribram angegebenen Mikroreaktionen, bei denen lediglich bei gleichem Mengenverhältnis die Quantität der Reagentien herabgesetzt wird. Grundsätzlich gehen wir nicht ein auf alle Abänderungen, welche an Stelle des Komplementbindeverfahrens ein anderes Verfahren setzen, wie z. B. Präzipitation und Konglutination.

B. Kritische Besprechung der Art der einzelnen Methoden.

Die kurze Schilderung der verschiedenen Methoden hat bereits auffallende Verschiedenheiten erkennen lassen. Noch deutlicher treten die Unterschiede in einer tabellarischen Übersicht zutage, die wir nun bieten wollen (siehe Tabelle S. 60 u. 61).

In dieser Übersicht haben wir die unterscheidenden Punkte besonders hervorgehoben. Eine kurze Besprechung läßt etwa folgendes erkennen: Hinsichtlich der gesamten Flüssigkeitsmenge herrscht im allgemeinen ziemliche Übereinstimmung; die Gesamtmenge ist überwiegend nunmehr mit 2,5 ccm gewählt. Nur die Abänderungen von Boas und Sormani halten noch an dem alten Volumen von 5 ccm fest. Aus dieser Konstanz der Menge fällt die Methode von Müller-Landsteiner mit Aktivserum heraus, die auf Grund der Verwendung von Tropfkapillaren statt kalibrierter Pipetten die gesamte Flüssigkeitsmenge abstufen muß. Da namentlich an Extrakt eine verschiedene Tropfenzahl gegeben wird, so nimmt bei Beibehaltung einer bestimmten Basis an Koch-

salz die Gesamtmenge mit der Steigerung der Extrakttropfen zu. Der Fehler, der hierdurch verursacht wird, darf allerdings nicht zu groß bewertet werden. Nach unseren Feststellungen wirken die wichtigsten Agentien nicht nach ihrer Konzentration, sondern nach ihrer absoluten Menge, ein etwas größerer oder geringerer Konzentrationsgrad für die einzelnen Agentien z. B. für das Alexin, wird kaum das Resultat ändern. Aber wie wir hervorgehoben haben, leidet darunter die Reaktionsgeschwindigkeit, und diese Beeinflussung wird bei einer Methode um so größer sein, die wie die von Müller-Landsteiner bei Vor- und Hauptversuchen bereits nach $^1/_2$ Stunde die Ablesung vornimmt. Grundsätzlich muß daher der Standpunkt vertreten werden, daß die gesamte Menge und hierdurch auch der Anteil der einzelnen Agentien im Flüssigkeitsvolumen dieselben bleiben. Hie und da wird sich allerdings die Notwendigkeit herausstellen, insbesonders bei zu geringer Menge an Patientenserum, mit einer kleineren Gesamtmenge zu arbeiten; wir haben dann alle Mengen für die einzelnen Agentien um die Hälfte vermindert und dadurch auch die Gesamtmenge von 2,5 ccm auf 1,25 ccm. Wir werden später noch darauf zurückkommen.

Viel wichtiger ist der Anteil der Erythrozytenmenge an dem Flüssigkeitsvolumen; denn es handelt sich hier um die Beizung (Präparierung) bestimmter Mengen von Erythrozyten durch ein dagegen gerichtetes Antiserum und um die nachfolgende Einleitung der Lysis durch das Alexin (Komplement). In Übereinstimmung mit andern Autoren haben wir gefunden, daß der Bedarf an Antiserum proportional der Erythrozytenmenge ist. Es scheint daher sehr wichtig, um Vergleiche anzustellen, daß stets dieselbe Dichte der Blutkörperchenaufschwemmung vorhanden ist. Wie aus der Übersicht sich ergibt, wird bei den hauptsächlichsten Methoden eine 1proz. Aufschwemmung — auf die Gesamtmenge bezogen — gewählt, bzw. ein gleicher Anteil einer 5proz. Aufschwemmung für die Gesamtmenge genommen. Unter dieser Voraussetzung ist eine Einheit der Blutmenge in Verwendung, und man kann diese Menge direkt als Bluteinheit oder Erythrozyteneinheit bezeichnen. Der Widerstand gegenüber dem Hämoglobinaustritt kann für diese Bluteinheit im allgemeinen als

Die wichtigsten Methoden für die

Methode	Gesamtmenge	Erythrozytenanteil	Vorversuche							
			Ambozeptorauswertung			Alexinauswertung				Extrakt
Mit Inaktivserum	ccm		Alexin	Ablesezeit	Dosis	allein	Ablesezeit	mit Extrakt	Dosis	
Original-Methode nach Wassermann	2,5	0,5 ccm von 5% Aufschw. = 1%	0,5 ccm der Verd. 1:10	2 Std. bei 37° 1 Std. Wasserbad	4facher Titer	keine			0,5 ccm der Verd. 1:10	fallweise
Nach H. Sachs (Frankfurter Methode)	2,5	0,5 ccm von 5% Aufschw. = 1%	0,5 ccm der Verd. 1:10	½ bis ¾ Std. bei 37° C	3- bis 4facher Titer	keine			0,5 ccm der Verd. 1:10	regelmäßig in 6 Abstufungen
Nach E. Sonntag	2,5	0,5 ccm von 5% Aufschw. = 1%	0,5 ccm der Verd. 1:10	1 Std. bei 37° C	5facher Titer	ja	1 Std. bei 37° C	mit allen Extrakten und event. mit Serum	doppelter Wert gewöhnlich 0,5 ccm der Verd. 1:10	fallweise
Nach Boas (dänische Methode)	5,0	1,0 ccm von 5% Aufschw. = 1%	1,0 ccm der Verd. 1:10	2 Std. bei 37° C	2½facher Titer	ja	2 Std. bei 37° C	mit 0,2 ccm eines unspez. Extraktes	jeweiliger Titer mit Extrakt	fallweise
Nach Sormani	5,0	1,0 ccm von 5% Aufschw. = 1%	—	—	8- bis 12fach. Titer	ja	½ Std. bei 37° C	mit 0.25 ccm eines unspez. Extraktes	jeweiliger Titer mit Extrakt	fallweise
Mit Aktivserum										
Nach R. Müller-Landsteiner	2,8 bis 4,2	1 Tropfen der 50 proz. Aufschw. = 0,9 bis 0,6%	1 Tropf. = 0,05 ccm unverdünnt	½ Std. bei 37° C	3facher Titer	keine			0,05 ccm unverdünnt	fallweise

konstante Größe angenommen werden. Dieser Anordnung entspricht auch die Methode von Müller-Landsteiner, da die zugegebene Erythrozytenmenge stets die gleiche ist. Die Aufschwemmungsdichte ist bei dieser Methode allerdings statt 1 proz. auf 0,9 bis 0,6 Proz. je nach der Gesamtmenge herabgemindert. Von großer Wichtigkeit sind die Unterschiede in der Vornahme der Vorversuche bei den einzelnen Methoden.

Wassermann'sche Reaktion bei Syphilis.

Hauptversuch						
Extrakt	Patientenserum	Einwirkung und Alexin	Haemolytisches System		Einwirkung und Ableseart	Kontrollen
			Sensibilisierung	getrennter Zusatz		
Nur alkoholischer Luesleberextrakt 2 Extrakte	0,1 ccm in 0,5 ccm der Verd. 1:5	in Menge 1,5 ccm 1 Std. bei 37° C oder Wasserbad	nein	ja, nur gute Mischung	Nach Lösung der Kontrollen bei 37° C	1 posit. und 1 negat. Serum-, Extrakt- und Serumkontrolle in doppelter Menge
1 unspez. Menschenherzextrakt und 1 unspez. Rinderherzextrakt mit Cholesterin in 6 Abstufungen	0,5 ccm der Verd. 1:10 = 0,05 ccm	1½ Std. bei 37° C	nein	getrennt od. nach kurzer Mischung	I. Ablesung: nach 2 Std. bei 37° C II. Ablesung: am nächsten Morgen	1 posit. und 1 negat. Serum-, Extrakt- und Serumkontrolle in einfacher Menge
gewöhnlich alkoh. Luelleberextrakt und 1 unspez. Ätherextrakt in 4 Abstufungen	0,1 ccm im allgem. und 0,2 ccm als Kontrolle	in Menge 1,5 ccm ½—1 Std. bei 37° C	¼ Std.	nein	I. Ablesung: nach 1 Std. bei 37° C und ¼ Std. bei Zimmertemperatur. II. Ablesung: am nächsten Tag	1 posit. und 1 negat. Serum-, Extrakt-, Serum- und Systemkontrolle
1 unspezifischer Extrakt (Menschenherz)	0,2 ccm in 5 Abstufungen bis 0,01 ccm	Titer mit Extrakt ¾ Std. bei 37° C	nein	ja	I. Ablesung: nach 2 Std. bei 37° C II. Ablesung: am nächsten Tag colorimetr. Beurteilung mit Hämoglobinometer	1 posit. und 1 negat. Serumkontrolle. Keine Extraktkontr. Serumkontr. mit einfacher Alexindosis
Unspezifischer Extrakt in 5 Abstufungen	0,2 ccm	Titer mit Extrakt	1 Std.	nein	½ Std. bei 37° C	1 posit. u. negat. Serumkontrolle. Serumkontr. mit 0,2 ccm Extraktkontrolle in 5 Abstufungen
1 unspez. alkoh. Extrakt und ein besonderer unspez. Extrakt in 3 Abstufungen (4, 5 und 6 Tropfen)	1 Tropfen = 0,05 ccm	Menge verschieden. 1 Std. bei 37° C	nein	ja	I. Ablesung: ½ Std. bei 37° C II. Ablesung: ½—¾ Std. bei Zimmertemperatur	Ausgedehnte Extraktkontrollen. Serumkontrolle

1. Bestimmung des Ambozeptortiters und der Gebrauchsdosis.

Unter dem Ambozeptortiter ist diejenige kleinste Menge eines inaktivierten hämolytischen Antiserums zu verstehen, die für die völlige Lösung der Bluteinheit bei nachträglichem Zusatz einer bestimmten Alexinmenge erforderlich ist. Für die Feststellung dieses Titers sind abgesehen von der Bluteinheit die Alex-

inmenge und die Ablesezeit von Einfluß. Unsere Übersicht über die verschiedenen Methoden läßt erkennen, daß die Alexinmenge für die Bestimmung des Ambozeptortiters stets für die Gesamtmenge von 2,5 ccm mit 0,5 ccm der 10fachen Verdünnung und für 5 ccm mit 1 ccm dieses Verdünnungsgrades gewählt wird. Für die Wahl der Alexinmenge von 0,5 sind besondere methodische Gründe in der Literatur nicht zu finden. Offenbar wird diese Menge lediglich genommen, weil nach der Vorschrift von Wassermann für den Hauptversuch wie für den hämolytischen Vorversuch stets 0,5 ccm Alexin (Komplement) genommen wird. Es muß jedoch besonders betont werden, daß dieser Ausgangspunkt für die Feststellung des Titers eines Antiserums rein willkürlich ist. Man könnte geradeso von Aktivserum die Menge mit 0,4, 0,3 oder 0,2 ccm nehmen. Wassermann und Lange sagen in ihrer letzten ausführlichen Beschreibung der Reaktion, daß die Wirksamkeit des Ambozeptors in ausschlaggebendem Maße von dem Reichtum des Meerschweinchenserums an Komplement beeinflußt wird, welch letzteres schwanken kann; je reicher ein Meerschweinchenserum an Komplement ist, desto höhere Ausschläge gibt die betreffende Ambozeptordosis, d. h. desto weniger Ambozeptor ist nötig, um das gleiche Hämolyseresultat zu erhalten. Die Notwendigkeit des hämolytischen Vorversuchs wird damit überhaupt begründet, aber nicht die Angabe, daß für diesen Vorversuch 0,5 ccm Alexinmenge genommen werden muß. Nach der von uns gefundenen Gesetzmäßigkeit in den Beziehungen zwischen Ambozeptor und Alexin steht die Höhe des Ambozeptortiters im umgekehrten Verhältnis zur Alexinmenge bzw. zur wirksamen Substanz in einer gegebenen Menge eines aktiven Serums Es ist von vorneherein anzunehmen, und entspricht auch der Erfahrung, daß die Wirksamkeit des einzelnen hämolytischen Antiserums an sich eine weitgehende Konstanz aufweist, und Schwankungen des Ambozeptortiters überwiegend durch die komplettierende Kraft im Aktivserum bedingt sind. Die Notwendigkeit für die Vornahme des hämolytischen Vorversuches ist mit diesen Verschiedenheiten begründet. Aber nach den Veränderungen im Lösungseffekt bei Hämolysenversuchen, namentlich je nach

der Alexinmenge wissen wir auch, daß der Verlauf der Reaktion ein verschiedener ist.

Für die Ablesezeiten ist der Reaktionsverlauf von großer Wichtigkeit. Unsere Übersicht läßt ersehen, daß diese Ablesezeiten für die einzelnen Methoden sehr schwankend sind. Nach der Originalmethode wird die Ablesung nach 2 Stunden im Brutschrank vorgenommen, ebenso nach der Methode von Boas; nach der Frankfurter Methode und nach den Methoden von Sonntag und Müller nach ½ Stunde bzw. nach 1 Stunde. Es ist vorerst die Frage zu beantworten, ob nicht diese verschiedenen Ablesezeiten einen bestimmten Einfluß auf die Höhe des gewählten Ambozeptortiters ausüben. In der Literatur sind nur wenige genauere Angaben darüber zu finden. Lediglich Eisenberg und Nitsch[1]) geben an, daß der Ambozeptortiter für komplette Hämolyse nach ¼ Stunde im Brutschrank 2 bis 7mal größer ist als für einen solchen nach ¾ Stunden und noch größer nach 2 Stunden. Auch diese Angabe ist etwas allgemein gehalten. Da aber diese Frage von Wichtigkeit ist, und die Ablesezeiten auch rein praktisch für die zeitliche Durchführung großer Untersuchungen von Bedeutung sind, haben wir ausgedehnte Untersuchungen nach beiden Richtungen — Einfluß der Alexinmenge und der Ablesezeit — vorgenommen. Als Antisera haben wir dabei eigene nach der Vorschrift hergestellte und solche der Firma Merck (Darmstadt) verwendet. Von den Versuchen mit eigenen Immunseren wollen wir hervorheben: 11 Untersuchungen an dem Kaninchenserum Nr. 67 ergaben mit 0,5 ccm Komplement im Mittel nach ½ Stunde Brutschrank den Titer 1 : 1400, nach ¾ Stunden 1 : 2250, nach 1 Stunde 1 : 3200 und nach 2 Stunden 1 : 5000. Die Nachlösung ist daher je nach der Aufenthaltszeit im Brutschrank eine beträchtliche und ziemlich gleichmäßige. Bei Verwendung von 0,1 ccm Komplement wurde bei dem gleichen Immunserum gefunden: nach ½ Stunde Brutschrank der Titer 1 : 475, nach ¾ Stunden 1 : 650, nach 1 Stunde 1 : 985 und nach 2 Stunden 1 : 1112; entsprechend der Proportionalität zeigt sich also, daß eine kleinere Alexinmenge bei gleichen Zeiten eine wesentlich höhere Ambozeptordosis zur Lyse benötigt.

1) Z. f. I. Bd. IV, 1910.

Während das Verhältnis der Komplementmengen wie 1 : 5 ist, schwankt das Verhältnis zwischen den gefundenen Ambozeptordosen zwischen 1 : 3 und 1 : 4. Weitere Untersuchungen an einem hämolytischen Kaninchenserum Nr. 294 ergaben im Verlaufe von 24 Untersuchungen bei Verwendung von 0,5 ccm Alexin nach ½ Stunde einen Titer von 1 : 700, nach ¾ Stunden 1 : 1000, nach 1 Stunde 1 : 1270, nach 2 Stunden 1 : 1700; bei Verwendung von 0,1 ccm Komplement hingegen nach ½ Stunde den Ambozeptortiter 1 : 200, nach ¾ Stunden 1 : 500, nach 1 Stunde 1 : 650 und nach 2 Stunden 1 : 870. Auch in diesem Falle ist die Abhängigkeit des Ambozeptortiters von der Ablesezeit und von der Alexinmenge annähernd die gleiche wie beim Immunserum Nr. 67. Ausgedehnte weitere Untersuchungen zwei Monate hindurch ergaben an Immunseren der Firma Merck mit der Titerangabe 1 : 3000 für den Monat Mai einen mittleren Titer bei 20 Untersuchungen nach ½ Stunde 1 : 2700, nach ¾ Stunden 1 : 3600, nach 1 Stunde 1 : 5400 und nach 2 Stunden 1 : 5500. Für die gleichen Zeiten in derselben Reihenfolge war der Titer bei Verwendung von 0,1 ccm Alexin 1 : 850, 1 : 1370, 1 : 2070 und 1 : 2600; im Monat Juni wurden für 15 weitere Untersuchungen von Immunseren der Firma Merck gefunden: bei 0,5 ccm Alexin in derselben Reihenfolge der Titer 1 : 2560, 1 : 3150, 1 : 3430 und 1 : 4900; mit 0,1 ccm Komplement 1 : 1030, 1 : 1560, 1 : 1840 und 1 : 2080. Als praktisches Ergebnis dieser Untersuchungen ergibt sich etwa folgendes: Nach unserer Feststellung der Gesetzmäßigkeit in den Beziehungen zwischen Ambozeptor und Alexin ist die Abhängigkeit der Höhe des Ambozeptortiters von der Alexinmenge eine gegebene Tatsache. Praktisch ist es von Wichtigkeit, daß bei Verwendung von 0,5 ccm Komplement nicht selten der Gehalt an Normalpräparinen so bedeutend ist, daß ein Ambozeptortiter d. h. eine Lysisgrenze bei normaler Versuchsanordnung nicht gefunden wird. Lösungen über 1 : 10000 kommen da vor, die wirkliche Höhe des Ambozeptortiters ist mit dieser Alexinmenge nicht zu ermitteln. Mit 0,1 ccm Komplement gelingt jedoch die Feststellung des Titers, da hier die Menge an Normalpräparinen auf $^1/_5$ vermindert ist und diese geringe Menge bei gleichbleibender Blut-

einheit keinen störenden Einfluß mehr ausübt. Aus diesem Grunde schlagen wir vor, bei Bestimmung des Ambozeptortiters stets eine doppelte Auswertung mit 0,5 und 0,1 Alexin vorzunehmen.

Wichtig ist noch die Wahl der Ablesezeit. Aus praktischen Gesichtspunkten empfiehlt es sich, die Röhrchen nicht 2 Stunden im Brutschrank zu lassen, sondern die Ablesung bereits nach ¾ Stunden vorzunehmen. Nach dieser Zeit geht die Reaktion nur mehr sehr langsam weiter. Mit einem Ablesetermin von nur ¾ Stunden wird über eine wertvolle Stunde gewonnen, die nach dem Wassermannschen Verfahren verloren geht.

Die Wahl des Ablesetermins hängt jedoch auf das innigste zusammen mit der Wahl der Gebrauchsdosis des Ambozeptors. Meirowsky[1]) sagt mit Recht: „Für die Stärke des Ambozeptors gibt es kein einheitliches System. Es wird die 2-, 3-, 4- und 5fache Ambozeptordosis für die Ausführung desHauptversuchs verlangt. Mit dieser Angabe ist die Mannigfaltigkeit noch gar nicht erschöpft. Es gibt Autoren, wie z. B. Stern, die die einfache Ambozeptordosis verwenden, und andere, wie z. B. Sormani, die mit der 12fachen Dosis arbeiten. Feste Anhaltspunkte für die Wahl der Ambozeptorgebrauchsdosis waren eben bisher nicht vorhanden. Die Ansichten gingen überaus weit auseinander. Während Sachs und Altmann sagen, daß erfahrungsgemäß ein Ambozeptorüberschuß in ziemlich weiten Grenzen für das Zustandekommen des Wassermannschen Phänomens belanglos ist, geben Eisenberg und Nitsch an, daß bei der überwiegenden Mehrzahl der positiv reagierenden Sera sich durch mehr oder weniger großen Ambozeptorüberschuß die positive Reaktion zum Verschwinden bringen lasse. Für den letzteren Fall ist die Erklärung damit gegeben, daß offenbar die Alexinmenge trotz stark steigender Ambozeptorüberschüsse die gleiche geblieben ist. Mit dem Hinweis von Eisenberg und Nitsch, daß größere Ambozeptorüberschüsse deshalb zu vermeiden sind, da dadurch positive Reaktionen verdeckt werden können, und andrerseits, daß der Nachteil eines zu geringen Ambozeptorüberschusses darin bestehe, daß öfters Hemmungen

1) D. med. W. Nr. 27, 1912.

in den Serumkontrollen sich ergeben, wurde bereits ein wichtiger Gesichtspunktan gedeutet. Aber erst die gefundene Gesetzmäßigkeit gibt völlige Klarheit. Der Ambozeptorüberschuß muß so groß sein, daß der Alexinbedarf bereits eine gewisse sehr kleine Größe erreicht hat, die bei Wachsen des Überschusses nur wenig abnimmt, und daß ferner gleichzeitig die Reaktionsgeschwindigkeit bereits ziemlich groß ist und dementsprechend die Lösungsbreite klein geworden ist. Dies trifft bei der Wahl einer Ambozeptordosis mit dem 3- bis 4fachen Wert für ³/₄stündige Brutschrankeinwirkung zu. Größere Ambozeptorüberschüsse sind überflüssig, und kleinere verlangen eine Erhöhung der kostbaren Alexinmengen; bewirken auch zugleich eine Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit und Vergrößerung der Lösungsbreite.

2. Alexintiter und Gebrauchsdosis.

Die Übersicht über die einzelnen Methoden läßt auch erkennen, daß nur bei einigen Methoden eine besondere Feststellung der komplementierenden Kraft des Alexins vorgenommen wird. Dies trifft nicht zu für die Originalmethode und für die Frankfurter Methode bei Verwendung inaktivierter Sera, und auch für die Methode von Müller-Landsteiner bei Verwendung von Aktivseren. Bei diesen Methoden wird stets die gleiche Alexinmenge (0,5 ccm der Verdünnung 1:10) verwendet. Bei anderen Methoden wieder, wie bei denen von Sonntag und Boas wie auch Sormani findet hingegen eine regelmäßige Feststellung des Titers statt. Für die Austitrierung des hämolytischen Immunserums und des Alexins gibt es — wie Sachs und Rietz hervorgehoben haben — zwei Möglichkeiten: entweder wird bei gleichbleibender Komplementdosis bei jeder Versuchsreihe eine Titrierung des hämolytischen Serums vorgenommen, wie bei der Originalmethode, oder es wird bei gleichbleibender Menge Immunserum eine regelmäßige Bestimmung des Komplementbedarfs vorgenommen. Wir haben bereits früher auf die Notwendigkeit einer ständigen Bestimmung des hämolytischen Immunserums hingewiesen. Sollen wir nun von einer Auswertung des Alexins Abstand nehmen? Diese Frage kann nur nach Klarstellung der Bedeutung des Kom-

plements für die Hämolyse und Komplementbindung beantwortet werden. Wassermann und Lange treten für Verwendung einer stets gleichen Menge Komplement in der Annahme ein, daß hierdurch ein gleichmäßiger Überschuß gesichert sei. Bei einem Überschuß an Komplement besteht aber die Gefahr, daß bei einem geringeren Reaktionskörpergehalt des Patientenserums trotz spezifischer Bindung noch genügend Komplement für das hämolytische System übrig bleibt und dadurch die spezifische Komplementbindung verdeckt wird. Anderseits ist bei Verwendung von wenig Komplement die Befürchtung gerechtfertigt, daß bei starker Eigenhemmung des Extraktes oder des Patientenserums für das hämolytische System nicht mehr genügend Komplement vorhanden ist, so daß also auch bei Prüfung negativer Sera eine Hemmung eintritt. Immerhin neigt eine immer größere Anzahl von Autoren dahin, grundsätzlich möglichst geringe Mengen Komplement zu verwenden, um die Schärfe der Reaktion zu erhöhen.

Betrachten wir zunächst, inwiefern Unterschiede vorhanden sind zwischen der bei den verbreitetsten Methoden üblichen Komplementmenge von 0,5 ccm und dem für das gegebene hämolytische System erforderlichen Alexinbedarf. Ähnlich, wie für den Begriff der Ambozeptoreinheit, kann auch als Alexin- (Komplement-) Einheit diejenige kleinste Menge eines aktiven Serums (Meerschweinchenserums oder eines anderen frischen Serums) bezeichnet werden, die für die völlige Lösung der jeweiligen Bluteinheit bei einem bestimmten Überschuß an Immunserum erforderlich ist. Die Bestimmungen des Komplementtiters haben im allgemeinen ergeben, daß Schwankungen der komplementierenden Kraft der Aktivsera in einem bestimmten Umfang vorhanden sind. Man hat darauf hingewiesen, daß diese Schwankungen z. B. bei einem Meerschweinchenserum von der Herkunft des Tieres, seinem Alter, der Art der Pflege, der Fütterung, sowie dem Gesundheitszustande abhängen. Aber auch die Gewinnung des Serums ist nicht gleichgültig. Nach der Methode der Blutentnahme, dem Zeitpunkt derselben (ob vor oder nach andauerndem Hunger), nach der Dauer des Beisammenbleibens des Serums mit dem Blutkuchen, und namentlich nach der Art der Aufbewahrung des Serums kann der Titer schwan-

ken, und schließlich ist die Art der Titrierung auch von großer Bedeutung. Außerdem ist nach der gefundenen Gesetzmäßigkeit die Höhe des Komplementtiters von der angewendeten Menge des Ambozeptors abhängig. Überdies ist es Tatsache, daß das hämolytische Immunserum, ähnlich wie andere Immunseren, lange Zeit konstante Wirkung zeigt, das Komplement hingegen sich mehr oder weniger rasch verändert. Maslakowetz und Liebermann[1]) haben schon im Jahre 1909 die Vermutung ausgesprochen, daß die Schwankungen der komplementierenden Energie eines Aktivserums die Hauptquelle der Fehler der Wassermannschen Reaktion sein dürften. Angaben in der Literatur über diese Schwankungen des Komplementtiters sind nicht reichlich zu finden. Auch sind namentlich Mitteilungen über die Art der Versuchstechnik und über die Höhe der angewendeten Ambozeptormenge und die Reaktionszeit spärlich. Boas gibt in seiner letzten Schrift an, daß er bei Untersuchungen an mehr als 100 Meerschweinchen als kleinste totallösende Komplementdosis bei einem Gesamtvolumen von 5 ccm und einer Blutmenge von 1 ccm der 5proz. Aufschwemmung und 2fachem Ambozeptortiter Schwankungen von 0,04 bis 0,07, im Mittel etwa 0,05 ccm gefunden habe. Wird wie bei Leschly die Gesamtmenge auf 2,5 ccm verringert, und damit auch die Erythrozytenmenge auf die Hälfte reduziert, so ergibt sich bei nur 2facher Ambozeptormenge als kleinste lösende Komplementdosis im Mittel 0,02 nach 2stündigem Verweilen bei 37°. Sonntag ermittelte für über 200 Meerschweinchen bei gewöhnlicher Bluteinheit und 5 fachem Ambozeptorüberschuß einen Komplementtiter, der zwischen 0,01 bis 0,03 schwankte. Andere Autoren wie Stern, Bruck, Trinchese haben Werte gefunden, die zwischen 0,025 bis 0,1 lagen. Von diesen Autoren liegen jedoch keine Mitteilungen über den Ambozeptorüberschuß und die Ableseart vor.

Unsere Erfahrungen hinsichtlich der Bestimmung des Komplementtiters bei einem Gesamtvolumen von 2,5 ccm, bei normaler Bluteinheit und einem 4fachen Ambozeptorüberschusse nach ¾-stündiger Einwirkung im Brutschrank sind folgende:

1) Z. f. I. Bd. II, 1909.

Mai 1916	Mittelwert	0,012 ccm		8	Meerschweinchen
Juni 1916	»	0,010	»	8	»
Juli 1916	»	0,010	»	16	»
August 1916	»	0,014	»	12	»
September 1916	»	0,013	»	18	»
Oktober 1916	»	0,011	»	21	»
November 1916	»	0,011	»	19	»
Januar 1917	»	0,020	» [1])	15	»
Februar 1917	»	0,018	» [1])	85	»
März 1917	»	0,010	»	93	»
April 1917	»	0,009	»	53	»
Mai 1917	»	0,012	»	55	»
Juni 1917	»	0,011	»	25	»

Nach diesen Feststellungen ist ersichtlich, daß unsere Monatsmittelwerte verglichen mit den Befunden anderer Autoren die niedrigsten Ziffern darstellen. Noch wichtiger als diese Mittelwerte ist die Tatsache, daß die Werte von Meerschwein zu Meerschwein, von Mischserum zu Mischserum schwanken, manchmal viele Tage den Wert von 0,01 ccm aufweisen, dann wieder bei gleicher Gewinnung und Behandlung die Höhe von 0,03 und sogar 0,04 ccm erreichen.

Sehr wichtig für jede Komplementbindung ist die Feststellung der Veränderung des Komplementtiters beim Altern des Meerschweinchenserums.

Es ist seit langem bekannt, daß der Gehalt an Komplement von der Dauer der Aufbewahrung des Serums abhängig ist. Eingehendere Versuche nach dieser Richtung hat auch Leschly angestellt (S. 515). Er fand, daß beim Lagern des Serums, sei es bei 0° sei es bei Stubentemperatur und sowohl beim Lagern mit dem Gerinnsel wie abpipettiert allmählich eine Veränderung eintritt, die zur Folge hat, daß die Komplementwirkung von der Ambozeptormenge im höheren Maße abhängig wird. Wir legten eine besondere Wichtigkeit der Feststellung bei, ob das Komplementserum bei längerer Aufbewahrung in Zimmertemperatur in seinem Gehalt starke Veränderungen erleidet. Die fortlaufenden Feststellungen des Komplementtiters an vielen Meerschweinchen-

1) Die höheren Mittelwerte in den Monaten Januar und Februar sind durch die Aufbewahrungart bewirkt worden. Die Meerschweinchen wurden tags vorher entblutet und das Serum mit Blutkuchen in Schalen über Nacht im Laboratorium stehen gelassen.

seren ergaben: einige Seren zeigten einen regelmäßigen Rückgang vom ersten Tage an. So wurde für die 4fache Immunserumdosis am ersten Tage die Bedarfsmenge von 0,01 gefunden, am zweiten 0,02, am dritten Tage 0,06, am vierten Tage war die erforderliche Menge bei mehr als 1,0 Komplementverbrauch wegen Mangel an Serum nicht mehr genau feststellbar. Andere Sera wieder hatten am ersten und zweiten Tage, manchmal sogar bis zum dritten Tage mit 0,01 oder 0,02 den gleichen Wert, so daß erst vom 3. bzw. 4. Tage an der Verbrauch auf 0,03 oder 0,04 und darüber stieg. Praktisch ergibt sich daraus die Forderung, daß unbedingt nur frische Meerschweinchensera, d. h. höchstens 1 Tag alte Seren für die Komplementbindung Verwendung finden sollten. Es scheint auch bedenklich, Komplementsera zu gebrauchen, die am 2. oder 3. Tage noch einen ziemlichen hohen Komplementgehalt aufweisen, da die verschiedene Art des Abbaues des Komplementes unter wechselnden Umständen vielleicht Unterschiede hervorbringen kann, die den glatten Ausfall der Reaktion behindern. Es genügt auch nicht, den Komplementtiter nur einmal am Tage zu bestimmen, da kleine Veränderungen selbst innerhalb eines Zeitraumes von 4 bis 6 Stunden eintreten können. Wir stellten Auswertungen des Komplementiters stets sowohl vor dem Versuche als auch gleichzeitig mit dem Hauptversuche an. So können selbst geringfügige Veränderungen des Komplementgehaltes festgestellt und berücksichtigt werden. Die einfache Art dieser Auswertungen des Komplements wird noch später beschrieben werden. Schließlich konnten wir auch die Erfahrung machen, daß bei zufällig kranken Meerschweinchen der Komplementgehalt wesentlich erniedrigt ist. Ein frisches Meerschweinchenserum ganz ohne Komplement konnte in keinem Falle gefunden werden.

Zwischen der bei der Originalmethode gleichmäßig verwendeten Alexinmenge von 0,05 ccm und unseren Mittelwerten von etwa 0,01 bis 0,015 ccm besteht ein großer Unterschied. Wenn man den Komplementtiter für das hämolytische System als Einheit bezeichnet, so wären in der Dosis für den Original-Wa. 3 bis 5 Einheiten, also ein recht gewaltiger Überschuß vorhanden. Wir haben schon darauf hingewiesen, daß dadurch schwach positive Reaktionen

verdeckt werden können. Weitere wichtige Störungen können ausgehen von Patientenserum und von den Organextrakten, die an Stelle wirklicher Antigene bei der Serumreaktion der Syphilis Anwendung finden.

3. Das Patientenserum.

J. Bauer[1]) hat zuerst darauf aufmerksam gemacht, daß jedes Menschenserum an sich stark hemmende Eigenschaften besitzt, die besonders dann deutlich zum Ausdruck kommen, wenn die hämolytischen Komponenten durch Inaktivierung und Digerieren mit Menschenblut entfernt werden. Im gleichen Jahre stellte Hecht[2]) fest, daß Sera gesunder Menschen, mit Hammelblut vorbehandelt, meistens $^4/_{10}$ bis $^5/_{10}$ des hinzugefügten für die Hämolyse erforderlichen Meerschweinchenserums binden, solche von Luetikern und anderen Kranken $^6/_{10}$ bis $^9/_{10}$; daß sich dann auch Luessera mit wenig, anderseits normal Sera mit starker Eigenhemmung finden. Auch Hecht kommt zur Ansicht, daß in jedem normalen Menschenserum eigenhemmende Stoffe in mäßiger Menge zu finden sind, in größerer Menge aber insbesondere bei Erkrankungen wie Lues, Tuberkulose und anderen konsumierenden Krankheiten. Die Stärke der Eigenhemmung sei von der Menge des Serums direkt abhängig. Im normalen Serum werde die Wirkung dieser eigenhemmenden Stoffe von den Normalambozeptoren (Normalpräparinen) ganz, im luetischen teilweise ausgeglichen. Hecht bezeichnet Sera mit Eigenhemmung als autrope — eigenbindende oder eigenhemmende. Diese Angaben wurden später von Ehrmann und Stern[3]) sowie von Kiß[4]) im wesentlichen bestätigt. Hesse[5]) bringt die starke Eigenhemmung der Luessera mit dem Vorhandensein von Luesreaginen in engsten Zusammmenhang und ist der Überzeugung, daß die Feststellung dieser Eigenhemmung allein genügend sei, um ein Patientenserum als Luesserum zu erklären.

1) B. kl. W. 1909, Nr. 17.
2) W. kl. W. Nr. 8, 1909.
3) B. kl. W. Nr. 7, 1910.
4) Z. f. I. Bd. IV, 1910.
5) Wiener kl. W. Nr. 20, 1916.

Diese Sachlage ergibt die Notwendigkeit, der Eigenhemmung der Patientensera besondere Aufmerksamkeit zu widmen. Wir sprechen bereits jetzt unsere Überzeugung dahin aus, daß es nicht genügt, durch eine einfache Serumkontrolle bei einem großen Überschuß an Komplement auf Eigenhemmung zu prüfen, sondern daß jedesmal eine genaue Feststellung des Grades der Eigenhemmung erforderlich ist.

Eine weitere Eigenschaft der Patientensera ist ihr Gehalt an Normalambozeptoren (Normalpräparinen). Auf die Bedeutung dieses Gehaltes hat Meirowsky[1]) besonders aufmerksam gemacht. Meirowsky sagt wörtlich: »Ist in das Verhältnis von Ambozeptor und Komplement durch Austitrierung einigermaßen Ordnung hineinzubringen, so ist das praktisch ganz unmöglich, wenn in das hämolytische System das zu untersuchende Patientenserum hineinkommt. Dieses besitzt nämlich Normalambozeptoren für Hbl.-Körperchen in individuellen Mengen, die zu den Ambozeptoren des hämolytischen Systems hinzukommen und sie je nach ihrer Quantität in ihrer Gesamtwirkung verändern. Dadurch wird verständlich, daß schon geringfügige Schwankungen des künstlichen Ambozeptors durch das Hinzukommen des natürlichen genügen, um das Verhältnis der lösenden zu den hemmenden Faktoren zu verändern und den Ausfall der Reaktion im gleichen Serum zu beeinflussen. Zur Vermeidung dieser Fehlerquellen müßte jedes Serum auf seinen wahren Gehalt an Normalambozeptoren für Hbl. austitriert werden. Praktisch eine undurchführbare Forderung.« Müller (S. 36) hat 200 aktive Patientensera auf ihre hämolytische Wirksamkeit im Vergleich mit der im Versuch gebrauchten Ambozeptormenge untersucht. Es zeigte sich, daß kein einziges Patientenserum das Blut rascher löste als die einfache künstliche Ambozeptoreinheit. Nur ausnahmsweise kam ein oder das andere Serum diesem hämolytischen Werte ziemlich nahe. Praktisch heißt das also, „daß selbst ein Patientenserum mit relativ hohem Gehalt an natürlichem Ambozeptor das Resultat des Versuchs nicht einmal in einem solchen Grade beeinflussen kann, als es eine um eine Einheit vermehrte Ambozeptormenge tut".

1) l. c.

Diese Versuche sind jedoch deshalb nicht als einwandfrei zu bezeichnen, als bei Verwendung von aktivem Patientenserum außer dem normalen Ambozeptor noch das Eigenkomplement hinzukommt. Das Eigenkomplement erhöht die Gesamtmenge des Komplements ebenso wie der natürliche Ambozeptor die Gesamtmenge der Ambozeptoren. Welcher Faktor ist nun von größerer Bedeutung? Diese Frage blieb bei den Untersuchungen von Müller offen. Wir werden später darauf zurückkommen.

Die Frage der Vorbehandlung des Patientenserums muß besonders besprochen werden: die sogenannte Inaktivierung durch ½- oder 1stündiges Erwärmen des Serums auf 56⁰. Die Notwendigkeit dieser Erwärmung wird damit begründet, daß bei Aktivseren die Gefahr unspezifischer Hemmungen gegeben sei und bei ihnen auch das Eigenkomplement eine unerwünschte Rolle spiele.

Nach der Angabe von Wassermann (S. 988) ist es zweifellos, daß bei vergleichender Prüfung eines und desselben Serums im erwärmten und im unerwärmten Zustand im letzteren Falle eine größere Anzahl positiver Reaktionen erhalten wird als im ersteren, obwohl theoretisch nach dem Vorhandensein eines Eigenkomplements das Gegenteil zu erwarten wäre. Diese Erfahrung wird mit der Annahme zu erklären gesucht, daß durch die Erwärmung Veränderungen der Reaktionskörper selbst im Sinne ihrer Verminderung eintreten. Noguchi[1]) hat angegeben, daß die syphilitischen Antikörper bezüglich ihrer Fähigkeit, Hitze zu ertragen, sehr labil sind. Bereits beim Erwärmen auf 45⁰ C nur 20 Minuten lang werden sie bedeutend abgeschwächt; bei 50⁰, 55⁰, 60⁰ Erwärmen während 20 Minuten verminderten sich die Antikörper auf ½, ¼ und $^1/_6$. Nach Sachs und Levaditi u. a. werden die Antikörper bei einer Temperatur von ca. 75⁰ C in 20 Minuten zerstört. Diese große Beeinflußbarkeit des Gehaltes an Antikörpern durch Erwärmen sollte eigentlich dazu führen, nur Aktivsera zu verwenden. Aber das Hauptargument gegen deren Verwendung spricht Wassermann mit der Angabe aus, daß besonders bei fieberhaften Erkrankungen Aktivsera trotz Ausschluß

1) Z. f. I. Bd. VII, 1910.

einer luetischen Erkrankung oft positiv reagieren. Wassermann folgert daraus die praktische Regel, daß, um eine sichere Diagnose auf Lues zu stellen, keine Methode, die nur mit nicht erhitzten Seren arbeitet, für sich allein verwendet werden soll. Immerhin gibt es eine Reihe von Autoren, wie namentlich Müller-Landsteiner, Hecht, Stern u. a., die trotzdem die Verwendung von Aktivseren grundsätzlich bevorzugen. Die Berechtigung dieser Anschauung wird daher sorgfältig zu prüfen sein. Wir werden später im Zusammenhange darauf zurückkommen.

4. Die Organextrakte und deren Gebrauchsdosis.

Trotz zahlreicher Untersuchungen ist die alte Streitfrage, ob Alkoholextrakte aus syphilitischen Organen oder Normalorganen vorzuziehen sind, nicht geklärt. In den letzten Jahren ist allerdings eine Reihe namhafter Autoren zu den Normalorgan-Extrakten übergegangen. Doch gibt es noch immer unentwegte Anhänger der Luesextrakte. Hinsichtlich der Herstellung der einzelnen Extrakte wird auf die größeren Einzeldarstellungen von Wassermann und Lange, Boas, Müller, Sonntag u. a. verwiesen. Für die Beurteilung der Wirkungsart der einzelnen Extrakte sind bestimmte Eigenschaften gegenüber den Blutkörperchen sehr wichtig. Es handelt sich um das hämotoxische Vermögen und um die antikomplementäre Kraft der einzelnen Extrakte, wie die gangbare Bezeichnung lautet. Seit den Untersuchungen von Metschnikoff, Tarassewitsch, Morgenroth und Korschun ist bekannt, daß Organextrakte sehr häufig in erheblichem Grade hämolytisch wirken. Maslakowetz und Liebermann[1]) haben angegeben, daß die Größe der Dosen von spezifischen Extrakten, die Hammelerythrozaten zu hämolysieren vermögen, in sehr breiten Grenzen schwanken. Maslakowetz und Liebermann fanden mitunter Extrakte, die bereits in einer Menge von 0,2 ccm an sich hämolysierten. Kiß[2]) konnte diese Angaben noch mit der Feststellung erweitern, daß Organextrakte in größeren Dosen eine Eiweißfällung bewirken und erst in etwas kleineren Hämolyse hervorbringen und zugleich das Komplement

1) l. c. — 2) l. c.

beseitigen. Bei gleichbleibender Extraktmenge wird der Eintritt der Hämolyse in hohem Grade durch die Menge der zugesetzten Blutkörperchen beeinflußt.

Die antikomplementäre Wirkung ist besonders stark bei Alkoholextrakten, weniger stark bei wässerigen Extrakten. Nach Herstellung eines neuen Extraktes ist es allgemein üblich, daß man zunächst die sogenannte „alleinhemmende Dosis" des Extraktes bestimmt. Darunter versteht man nach Wassermann die Dosis, die ohne Zusatz von syphilitischen Seren für sich allein die Hämolyse hemmt. „Man gibt also beispielsweise in ein Reagenzglas 0,5 Extrakt und dazu statt des zu prüfenden Serums 0,5 physiologische Kochsalzlösung ein und 0,5 frisches Meerschweinchenserum in Verdünnung 1:10 und hernach nach stündigem Verweilen im Brutschrank das hämolytische System. Der gleiche Versuch wird mit bis 0,1 ccm abfallenden Extraktmengen angestellt. Zeigt sich nun z. B., daß selbst noch in denjenigen Röhrchen, in welche nur 0,1 ccm Antigen eingebracht wurde, die Hämolyse vollständig gehemmt ist, so wird man ein solches Extrakt überhaupt nicht verwenden, weil man naturgemäß bei der Gebrauchsdosis des Extraktes immer unter ½ der alleinhemmenden Dose bleiben muß."

Diese Bestimmungsart weist die schon mehrfach hervorgehobenen Unsicherheiten auf. Je nach der im angewendeten Aktivserum tatsächlich enthaltenen Alexinmenge wird die Extrakthemmung sehr verschieden groß ausfallen. Auswertungen dieser Art, auch bei demselben Extrakt, müssen von Tag zu Tag Änderungen aufweisen, da die verwendeten Aktivsera in der Regel verschiedenen Alexingehalt besitzen werden Auch nach der Frankfurter Methode wird die Extraktauswertung behufs Feststellung seiner antikomplementären Wirkung mit 0,5 ccm Meerschweinchenserum in der Verdünnung 1:10 ohne Berücksichtigung des tatsächlichen Komplementiters vorgenommen Nach der Angabe von Pöhlmann gilt ein Extrakt dann als brauchbar, wenn 0,6 des Extraktes in der Verdünnung 1:4 noch eine komplette Hämolyse geben. Es wurde schon früher betont, daß die meisten Extrakte in höheren Dosen an sich Hämolyse herbeiführen und

erst in kleineren antikomplementär wirken. Sonntag prüft gleichfalls den Extrakt gleichmäßig mit 0,5 Komplement in der Verdünnung 1:10. Ganz anders geht Boas vor. Er prüft konstant, welche Alexinmenge erforderlich ist, um nach Zusatz einer Extraktdosis von 0,2 ccm zum hämolytischen System noch völlige Hämolyse zu geben. Im allgemeinen wird beim Hauptversuche nicht mehr als die Hälfte der allein nicht mehr hemmenden Extraktdosis gewählt, vielfach geht man aber bis zur alleinhemmenden Dosis hinauf.

Zum Unterschiede von diesen Extraktbestimmungen prüfen wir jeden Extrakt in abfallenden Mengen mit der festgestellten Komplementtitermenge.

Extrakt-menge	Spezifische alkoholische Extrakte					Unspezif. alkohol. Extrakte	
	N. 10	N. 11	N. 14	I	X	II	UA_2
0,30 ccm	L	sH	Ltr	Ltr	Ltr	cH	fcH
0,20 »	fcH	dH	L	Ltr	Ltr	dH	ssH
0,15 »	ssH	fcH	ssH	Ltr	Ltr	ssH	L
0,10 »	L	cH	ssH	fcH	L	L	L
0,08 »	L	dH	L	cH	L	L	L
0,06 »	L	sH	L	dH	L	L	L
0,04 »	L	L	L	sH	sH	L	L
0,02 »	L	L	L	L	L	L	L

Wie aus dieser Tabelle zu ersehen ist, kann fast bei allen Extrakten eine hämolytische Wirkung größerer Dosen nachgewiesen werden. Erst allmählich schwindet diese Wirkung, so daß die antikomplementäre Wirkung unbehindert in die Erscheinung tritt. Die Extraktmenge, die keine antikomplementäre Wirkung mehr zeigt, schwankt in ziemlich weiten Grenzen. Wir haben auf diese Weise eine große Zahl von spezifischen und unspezifischen Extrakten verschiedenster Herkunft untersucht und hierbei gefunden, daß in den in der Tabelle angegebenen Dosen fast alle spezifischen Extrakte und hie und da auch ein unspezifischer Extrakt hämolytische Wirkung erkennen läßt. Auch hinsichtlich der antikomplementären Kraft sind die unspezifischen Extrakte wesentlich schwächer als die spezifischen. Die von uns verwendeten Extrakte waren fast ausschließlich alkoholische. Wir haben

aber auch einige wässerige Luesextrakte untersucht und fanden auch bei diesen ebenso wie bei Ätherextrakten sowohl hämolytische wie antikomplementäre Wirkung. Auch von Azetonextrakten wird angegeben, daß sie recht stark Komplement binden und dadurch zu unspezifischen Hemmungen-Anlaß geben. Vielfach werden auch Extrakte ohne antikomplementäre Wirkung oder nur mit Spuren einer Hemmung gefunden.

Da überwiegend alkoholische Extrakte Verwendung finden, erscheint die Feststellung wichtig, ob die hämolytische und antikomplementäre Wirkung der Extrakte mit durch den Alkoholgehalt verursacht sind. Kiß[1]) hat sich mit dieser Frage eingehend beschäftigt und festgestellt, daß in absolutem oder 90 proz. Alkohol allerdings die Blutkörperchen nur gehärtet werden ohne hämolysiert zu werden, während bei Verwendung von etwa 80 proz. Alkohol und Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung zunächst eine starke Eiweißfällung erfolgt und bei Verwendung von noch verdünnterem Alkohol, z. B. bei 20 Prozent, nach einer oder mehreren Stunden bei Bruttemperatur Hämolyse eintritt.

Der Extrakt kommt nicht allein mit dem hämolytischen System in Berührung, sondern im Hauptversuch auch mit Serum. Es taucht daher die Frage auf, ob der Serumzusatz die Extraktwirkung beeinflußt, oder ob die bekannte antikomplementäre Kraft mancher Sera sich einfach der antikomplementären Wirkung des Extraktes zugesellt, so daß eine Summierung der Komplementbindung eintritt. Die Annahme, daß letzteres eintritt, hat ja dazu geführt, gewöhnlich nur die Hälfte der alleinhemmenden Dosis Extrakt zu verwenden.

Eine weitere Frage geht dahin, ob der Serumzusatz etwa auch auf das hämolytische Vermögen, das die Extrakte in größeren Dosen zeigen, irgendwie einwirkt. Nach dieser letzteren Richtung verdanken wir ebenfalls Kiß wertvolle Untersuchungen. Kiß sprach unseres Wissens zuerst aus, daß die Sera die Blutkörperchen vor der Auflösung schützen, aber anderseits die komplementzerstörende Wirkung der Organextrakte verstärken.

1) l. c.

Einige Autoren, z. B. Sonntag, berücksichtigen bei der Bestimmung des Komplementtiters diese Serumeinwirkung, aber nur in folgender Weise: Hat z. B. der Komplementtiter die Grenzdosis von 0,02 in der Verdünnung 1:10 ergeben, so wird für den Hauptversuch trotzdem die Menge von 0,05 ccm genommen und zur Kontrolle der Extrakt mit einem negativen und einem positiven Serum und gleicher Komplementdosis angesetzt. Die in den Kontrollen erreichte Hämolyse sagt dann natürlich nur, daß der Komplementüberschuß sowohl für die Bindung des Extraktes als auch für die des zugesetzten Serums ausgereicht hat. Eine eigentliche Beurteilung, inwiefern das Serum auf die Extrakt-Komplementbindung einwirkt, ist mit einem derartigen Vorversuch nicht gegeben.

Wir haben eine große Zahl von spezifischen und unspezifischen Extrakten gleichzeitig auf hämolytische und antikomplementäre Wirkung ohne und mit Normalserumzusatz untersucht und hiebei fast völlig gleichmäßige Resultate erhalten.

	Alexin (Komplement)	Hbl. mit 4 fachem Ambozeptor	Extrakt I[1]	ohne	mit	Extrakt II[2]	ohne	mit
				Normalserum			Normalserum	
1	0,1	1,0	0,25	L	fc H	0,25	L	fc H
2	0,1	1,0	0,20	L	s H	0,20	L	d H
3	0,1	1,0	0,15	fc H	ss H	0,15	ss H	s H
4	0,1	1,0	0,10	fc H	L	0,10	fc H	L
5	0,1	1,0	0,08	d H	L	0,08	fc H	L
6	0,1	1,0	0,06	ss H	L	0,06	fc H	L
7	0,1	1,0	0,04	L	L	0,04	fc H	L
8	0,1	1,0	0,02	L	L	0,02	fc H	L

[1]) Alkoholischer Luesleberextrakt Nr. 45 der Fa. Gans.
[2]) » » von den Sächsischen Serumwerken.

Die Gesamtmenge in den Röhrchen betrug stets 2,5 ccm; Auffüllung erfolgte mit Kochsalzlösung. Hier ist die erste Ablesung nach ½ Stunde bei 37° C angegeben.

In dieser Tabelle sind nur Extraktabstufungen von 0,25 abwärts bis 0,02 ccm gewählt. An Alexin wurde hier wie in den zahlreichen andern Untersuchungen stets der Komplementtiter hinzugegeben, von Hammelblut 1 ccm der 2½ proz. Aufschwemmung; zur Gesamtmenge von 2,5 ccm wurde mit Kochsalzlösung

aufgefüllt. Bei etwa 50 derartigen Untersuchungen mit spezifischen Extrakten, und etwa 40 mit unspezifischen Extrakten wurde stets bei den höheren Extraktdosen ohne Normalserumzusatz ein lytischer Effekt beobachtet; in einer bestimmten Verdünnungszone folgten anfangs zunehmend, dann wieder abnehmend Hemmungserscheinungen oder es fehlten diese überhaupt, bis schließlich Hämolyse eintritt. Die einzelnen Extrakte zeigen bestimmte Abweichungen von diesem allgemeinen Verhalten, aber die charakteristische Reihenfolge ist stets erkennbar.

Der Serumzusatz bewirkt eine wesentliche Veränderung. Das hämolytische Vermögen der Extrakte ist nun verschwunden, und an die Stelle der Lysis sind Hemmungserscheinungen getreten, während in denjenigen Verdünnungen, wo früher abnehmende Hemmungserscheinungen sichtbar waren, nach Serumszusatz vollständige Lysis eintritt. Dieses gesetzmäßige Verhalten ist für die Beurteilung der Extrakt-Serumzusätze von großer Tragweite. Diese neue Erkenntnis veranlaßte weitgehende Untersuchungen, um die einzelnen Komponenten alkoholischer Extrakte und namentlich auch der Serumzusätze genau zu studieren. Nach den Untersuchungen von Kiß wird die Hämolyse durch Alkohol bei geringen Zusätzen von Blutserum gehemmt, bei großen Zusätzen dagegen gefördert. Der Alkohol zerstört aber anderseits auch das Komplement, und diese komplementzerstörende Wirkung des Alkohols wird durch den Zusatz von Menschenserum stets verstärkt.

Diese Angaben ließen einige Unklarheiten erkennen. Bei der Bedeutung der Frage, welchen Anteil an hämotoxischer und hämolytischer Kraft die Alkoholkomponente in den gewöhnlichen alkoholischen Extrakten zeigt, und wie anderseits von Alkohol befreite Extrakte wirken, erschien es notwendig, in viel ausgedehnteren Versuchsreihen wie bisher und in schärferer Gliederung die Verhältnisse völlig klarzulegen. Wir haben nach dieser Richtung eine große Zahl von spezifischen und unspezifischen alkoholischen Extrakten (auch Ätherextrakte) geprüft. Es ergab sich allmählich die wünschenswerte Klarheit. Ein Einblick in diese Ergebnisse soll durch tabellarische Zusammenfassung ver-

Alkoholischer, luetischer Föltalleberextrakt.

Gesamtmenge 2,5 ccm		Extrakt- bzw. Alkoholabstufungen in ccm														
Hbl 0,5 ccm der 5 proz. Aufschw. sensibilisiert mit 4 fachen Titer		1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01
I	Alkohol. Extrakt ohne Alexin und Serum	c H (EF)	c H (EF)	c H (EF)	fc H (EF)	d H (EF)	s H (EF)	ss H (EF)	L	L	L	L	L	fc H	c H	c H
II	wie I ohne Alexin, mit 0,1 Serum . .	c H (EF)	c H (EF)	s H (EF)	ss H (EF)	L	L	L	L	fc H	c H	c H	c H	c H	c H	c H
III	Alkohol 96 % ohne Alexin u. Serum	c H (EF)	d H (EF)	s H (EF)	L	L	L	L	L	fc H	c H	c H	c H	c H	c H	c H
IV	wie III ohne Alexin mit Serum	c H (EF)	fc H (EF)	ss H (EF)	L	L	L	L	L	fc H	c H	c H	c H	c H	c H	c H
V	Extrakt wie I alkoholfrei ohne Alexin u. Serum	d H (EF)	s H (EF)	s H (EF)	ss H (EF)	ss H (EF)	L	L	L	L	L	fc H	c H	c H	c H	c H
VI	wie V ohne Alexin. mit Serum	L	L	L	s H	fc H	c H	c H	c H	c H	c H	c H	c H	c H	c H	c H
VII	wie I mit 0,1 Alexin u. ohne Serum . .	c H (EF)	c H (EF)	c H (EF)	fc H (EF)	d H (EF)	s H (EF)	ss H (EF)	L	L	L	L	L	L	L	L
VIII	wie I mit 0,1 Alexin u. mit Serum . .	c H (EF)	c H (EF)	d H (EF)	ss H (EF)	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

sucht werden. In der ersten Tabelle liegen Untersuchungen mit einem spezifischen alkoholischen Fötalleberextrakt als Beispiel vor.

Die Gliederung der Tabelle dürfte ohne weiteres klar sein. Das hämolytische System und die Gesamtmenge sind dieselben wie bei allen Versuchen. Extraktabstufungen wurden von 1 ccm an bis 0,01 ccm genommen. Die ersten 2 Reihen (I und II) stellen die Einwirkung dieser verschiedenen Extraktmengen direkt auf sensibilisierte Blutkörperchen ohne Alexinzusatz dar. Es wird daher zum Ausdruck kommen, ob der Extrakt allein und in welcher Art er auf die Blutkörperchen einwirkt. In diesem Fall zeigt sich eine eiweißfällende Zone (EF) von 1,0 ccm an allmählich an Intensität abnehmend bis 0,4, daran anschließend eine lytische Zone von 0,3 bis 0,04 und schließlich eine wirkungslose Zone, bei der nur noch anfangs eine schwache lytische Wirkung zu erkennen ist. In der II. Reihe ist den sensibilisierten Blutkörperchen und den Extraktabstufungen noch 0,1 ccm Normalserum zugefügt. Das Ergebnis ist sehr beachtenswert. Die verschiedenen Einwirkungszonen sind wesentlich verschoben und zwar so, daß die eiweißfällende Zone einen geringeren Umfang aufweist und nur bis 0,7 geht, die anschließende lytische Zone nur bis 0,3 statt wie bisher bis 0,04 geht und die einwirkungslose Zone wesentlich verbreitert ist. Es zeigt sich somit eine auffallende Wirkung des Serumzusatzes, ganz ähnlich wie wir es früher bereits angegeben haben, nur kommt diese Erscheinung in den einzelnen Phasen bei diesen längeren Versuchsreihen viel klarer zur Geltung. In der Erwägung, daß es wichtig sei, die beiden Komponenten alkoholischer Extrakte, Alkohol und gelöste Stoffe, allein in ihren Wirkungen auf sensibilisierte Blutkörperchen ohne Alexinzusatz zu verfolgen, sind die folgenden Reihen III und IV und V und VI zustande gekommen. In der Reihe III ist die reine Alkoholwirkung ohne irgendwelchen Zusatz zu sehen: eine eiweißfällende Zone, die bis 0,8 reicht, eine lytische Zone bis 0,3 und eine wirkungslose Zone von 0,2 bzw. 0,1 an. Der Serumzusatz zum Alkohol hat auffallender Weise im Gegensatz zum alkoholischen Extrakt nicht die geringste Einwirkung. Die Zonenverteilung ist genau dieselbe geblieben. In den Reihen V und VI sind die durch den

Alkohol extrahierten Stoffe allein zur Anwendung gekommen, d. h. die alkoholischen Extrakte wurden bis zur Hälfte des Volumens vorsichtig eingedampft, und sodann mit physiologischer Kochsalzlösung wieder aufgefüllt. Durch Versuche mit noch stärkerer Eindampfung bis zur sirupartigen Konsistenz und darauffolgender Auffüllung wurde ermittelt, daß bereits beim Eindampfen bis zur Hälfte der Alkohol bis auf wirkungslose Reste verflüchtigt war, da die Extrakte beider Eindampfungsarten fast völlig gleiche Resultate zeigten. Die Reihe V läßt erkennen, daß die Eiweißfällungszone bei alkoholfreien Extrakten oder mindestens alkoholarmen Extrakten weiter reicht, wie bei Alkohol allein, aber weniger weit, als bei den alkoholischen Extrakten. Daraus läßt sich für die alkoholischen Extrakte im allgemeinen eine Summierung der eiweißfällenden Wirkung durch die beiden Anteile erkennen. Ebenso steht die lytische Zone in der Mitte zwischen jener bei der reinen Alkoholwirkung und jener der Wirkung des ursprünglichen Gesamtextraktes; die wirkungslose Zone schließt sich bei 0,05 an. Auffallend stark ist nun die Einwirkung eines Serumszusatzes auf den alkoholfreien Extrakt, wie dies in Reihe VI ersichtlich ist. Die eiweißfällende Zone ist verschwunden, selbst in den Röhrchen mit 1 ccm bis 0,8 ccm zeigt sich lytische Wirkung, weit oben, bei Extraktmengen, die ohne Serumzusatz noch Eiweißfällung erkennen lassen, beginnt bereits die wirkungslose Zone. In den Reihen VII und VIII ist den Röhrchen ohne und mit Serum Aktivserum in der für das hämolytische System erforderlichen Alexintitermenge zugegeben. Wird Reihe VII mit der zusammengehörigen Reihe I verglichen, so ist zu ersehen, daß das Aktivserum nicht die geringste Wirkung ausübt. Selbstverständlich ist in den Röhrchen mit 0,03 Extrakt und abwärts keine Hemmung, sondern bei erfolgter Komplettierung durch das Aktivserum Lysis eingetreten. Auch in der Reihe VIII mit Serumzusatz zeigt sich gegenüber der zugehörigen Reihe II keine Veränderung. Die Serumwirkung ist dieselbe geblieben, der Zusatz an Aktivserum aber hat keinen Einfluß ausgeübt.

Ähnlich war auch die Zonenverteilung bei anderen spezifischen Extrakten.

Ein Umstand fällt allerdings bei diesem Beispiel auf. Gewöhnlich wird angenommen, daß nicht die lytische Wirkung, sondern die Hemmungswirkung bei Extrakten in den Vordergrund trete. Von dieser Hemmungswirkung sehen wir in der Reihe VII und VIII nichts. Auf die lytische Zone durch Extraktwirkung folgt keine Hemmung, sondern sofort weiter Lysis infolge des Zusatzes von Aktivserum. Die Untersuchung einer größeren Zahl von alkoholischen spezifischen Extrakten in derselben Anordnung wie in diesem Beispiel ließ bei Alexinzusatz nur selten nach der lytischen Zone eine Hemmungszone wahrnehmen.

Es wäre möglich gewesen, daß diese interessante Zonenverteilung, die mehr oder weniger bei allen spezifischen alkoholischen Extrakten zu finden war, bei unspezifischen alkoholischen Extrakten eine wesentliche Veränderung erleidet. Die nächste Tabelle soll ein Beispiel dieser Art bringen (siehe Tabelle S. 84).

Es wurde ein alkoholischer Rinderherzextrakt gewählt, die Anordnung der Reihen ist genau dieselbe wie im früheren Beispiel. In der Schilderung der Unterschiede nach den einzelnen Reihen können wir uns daher kürzer fassen. Auch bei diesem unspezifischen Extrakt zeigt sich in den Fällen ohne irgendwelchen Zusatz eine weitgehende Eiweißfällungszone, eine kurze lytische Zone und dann die Zone ohne Beeinflussung; durch den Serumzusatz sind die Zonen nach den größeren Extraktmengen zu verschoben. Der alkoholfreie Extrakt in Reihe V zeigt eine etwas kleinere Eiweißfällungszone; der Serumzusatz beseitigt wieder diese Eiweißzone völlig; eine lytische Zone ist nur schwach angedeutet und der Alexinzusatz bei Reihe VII ohne und bei Reihe VIII mit Serumzusatz zeigt keine Einwirkung. Die Verteilung der Zonen ist daher bei dem alkoholischen Extrakt wie bei dem alkoholarmen Extrakt mit und ohne Serumzusatz in ähnlicher Weise verändert wie bei den alkoholischen spezifischen Extrakten. Doch muß betont werden, daß bei den unspezifischen häufiger wie bei spezifischen Extrakten die Eiweißfällungszone sehr schwach ausgebildet ist. Nach einer kurzen lytischen Zone folgt oft eine schwache Hemmungszone, die in diesem Beispiel fehlt. — Schließlich lag noch die Frage nahe, wie denn bei einer Abart eines

Unspezifischer, alkoholischer Normalorganextrakt (Rinderherz).

Gesamtmenge 2,5 ccm	Extrakt- bezw. Alkoholabstufungen in ccm														
Hbl. 0,5 ccm der 5proz. Aufschw. sensibilisiert mit 4fachem Ambozeptor-Titer	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01
I Alkohol. Extrakt ohne Alexin und Serum	cH (EF)	fcH (EF)	dH (EF)	sH (EF)	ssH (EF)	Sp(EF)	Sp(EF)	L	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH
II wie I ohne Alexin, mit 0,1 N-Serum	fcH (EF)	fcH (EF)	sH (EF)	ssH (EF)	L	L	fcH	fcH	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH
III Alkohol, 96% allein ohne Alexin u. Serum	fcH (EF)	sH (EF)	ssH (EF)	L	L	L	L	L	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH
IV wie III ohne Alexin mit N-Serum	fcH (EF)	ssH (EF)	Sp (EF)	L	L	L	L	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH
V Extrakt wie I, alkoholfrei ohne Alexin und Serum	dH (EF)	dH (EF)	dH (EF)	dH (EF)	dH (EF)	fcH	fcH	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH
VI wie V ohne Alexin mit N-Serum	dH	fcH	fcH	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH
VII wie I mit Alexintiter ohne Serum	cH (EF)	fcH (EF)	dH (EF)	sH (EF)	ssH (EF)	Sp(EF)	L	L	L	L	L	L	L	L	L
VIII wie I mit Alexintiter und mit Serum	fcH (EF)	fcH (EF)	dH (EF)	sH (EF)	ssH (EF)	Sp(EF)	Sp(EF)	L	L	L	L	L	L	L	L

unspezifischen Extraktes, beim Ätherextrakt von Lesser sich die Einwirkung der einzelnen Faktoren gestaltet. Die nächste Tabelle soll für diesen Extrakt die Einwirkungsart darstellen.

Lessers Aether-Extrakt (Normalorgan).

	Gesamtmenge: 2,5 ccm	Extrakt-Abstufungen								
	Hbl. 0,5 ccm der 5 proz. Aufschwemmung, sensibilisiert mit dem 4 fachen Ambrozeptor-Titer	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0,07	0,04	0,01
I	Extrakt ohne Alexin und Serum	L	fcH nachgelöst	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH
II	wie I ohne Alexin mit 0,1 N-Serum	ssH klar	dH klar	fcH	cH	cH	cH	cH	cH	cH
V	Extrakt wie I, ätherfrei ohne Alexin und Serum	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH
VI	wie V ohne Alexin mit 0,1 N-Serum	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH
VII	wie I mit Alexintiter, ohne Serum	ssH klar	sH klar	ssH klar	L	L	L	L	L	L
VIII	wie I mit Alexintiter und mit N-Serum	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Wir sehen bei im wesentlichen gleicher Versuchsanordnung (nur die Zahl der Röhrchen ist kleiner), daß der vom Äther befreite, eigentlich wässerige unspezifische Extrakt selbst in der Menge von 1 ccm keine Eiweißfällung, sondern nur Lysis zustande bringt und daß bereits bei 0,8 ccm die wirkungslose Zone beginnt. Der Serumzusatz hat den lytischen Effekt sichtlich herabgesetzt. Der Extrakt allein läßt überhaupt keine Beeinflussung, auch keine Lysis mehr erkennen, bei Serumzusatz zeigt sich keine Veränderung. Nach Zusatz von Alexin geht die lytische Zone etwas weiter, die Hemmung, auch bei den höheren Extraktmengen, ist überall sehr schwach; von 0,4 ccm an ist völlige klare Lysis zu finden. Nach Serumzusatz ist auch die schwache Hemmungszone gänzlich beseitigt und in allen Röhrchen Lysis eingetreten.

Reihe VII ist insofern interessant, als nach Zusatz des Aktivserums eine schwach ausgeprägte Hemmungszone deutlicher in die Erscheinung tritt als bei Reihe II.

Wie es scheint, lassen diese Versuche an Klarheit nichts zu wünschen übrig. Die Wirkung der einzelnen Faktoren der alkoholischen Extrakte ist deutlich zu erkennen. Der Einfluß des Serumzusatzes und auch der weitere Zusatz des Aktivserums, heben sich scharf ab. Bei den bisherigen Versuchsansätzen war diese scharfe Trennung der Wirkungszonen nicht so deutlich wahrzunehmen. Für die Praxis ergeben sich eine Reihe von Richtlinien. Vor allem ist die bisherige Vorschrift, daß man von dem Extrakt nur Mengen nehmen dürfe, die keine Eigenhemmung mehr zeigen, ungenügend. Der Extrakt wirkt auch direkt auf die Blutkörperchen[1]) als Gift ein. Die Eiweißfällungs-, die lytische und die Hemmungszone sind verschieden gelagert und in verschiedenem Umfang vorhanden. Vor allem jedoch ist bei vielen Extrakten — nach unseren Erfahrungen sogar bei der Mehrzahl — keine eigentliche Hemmungszone zu finden, sondern folgt der lytischen Zone sofort die unbeeinflußte. Es tritt daher die Forderung in den Vordergrund, bei jedem Extrakt die Zonenverteilung ohne und mit inaktiviertem Normalserum und ohne und mit Aktivserumzusatz zu ermitteln. Erst von jener Menge an, die auch keine lytische Wirkung mehr aufweist, ist der Extrakt für die Komplementbindung zu verwenden. Wie wir diese Erfahrungen für unsere Methode ausnützten, werden wir später im Zusammenhang erörtern.

Hier wäre noch hervorzuheben, daß wir auch die Angaben von Kiß, wonach die beiden Komponenten — Alkohol und extrahierte Stoffe — das Komplement zerstören, zu prüfen suchten. Wir konnten finden, daß sowohl die extrahierten Stoffe als der Alkohol in größeren Mengen für sich allein das Alexin angreifen, in den Mengen jedoch, in denen der Extrakt als Gebrauchsdosis in Verwendung kommt, eine zerstörende Wirkung auf das Alexin nicht wahrzunehmen ist. Auch aus den angeführten Versuchs-

1) Nach verschiedenen Versuchen, die wir mit sensibilisierten und unsensibilisierten Blutkörperchen anstellten, hat sich ergeben, daß der Beizungszustand der Blutkörperchen auf diese Extraktwirkung ohne Einfluß bleibt.

reihen ist ersichtlich, daß sich die unbeeinflußten Zonen mit und ohne Alexinzusatz in keiner Weise unterscheiden, während bei einer zerstörenden Wirkung des Extraktes sich ein Unterschied ergeben müßte. Auf andere Versuche dieser Art, die besondere Schwierigkeiten bieten, können wir in diesem Zusammenhange nicht eingehen.

Besonders die auffallende Einwirkung von inaktivierten Normalseren auf die Zonenverteilung der Extraktwirkung legt die Frage nahe, ob nicht andere Stoffe eine ähnliche Wirkung ausüben können. Wie bereits hervorgehoben, wird vielfach den einzelnen Extrakten Cholesterin beigemengt. Namentlich alle Institute und Untersuchungsstellen, die nach der Frankfurter Methode arbeiten, geben zu den alkoholischen Organextrakten mit Vorliebe eine 1proz. alkoholische Cholesterinlösung, und zwar auf 10 ccm alkoholischen Extrakt 1 ccm Cholesterinlösung. Das Cholesterin gehört allerdings zu den Alkoholen, aber immerhin ist anzunehmen, daß die Wirkung von der des Äthylalkohols wesentlich verschieden ist.

Walbum[1]) verdanken wir wertvolle Untersuchungen über die antihämolytische Wirkung verschiedener aliphatischer und aromatischer Alkohole. Er bestimmte die verschiedenen Mengen der kolloidalen Suspensionen dieser Stoffe, die eine Hämolysineinheit völlig zu binden vermögen. Als Hämolysin wurden verwendet Vibriolysin, Tetanolysin und Staphylolysin. Die Feststellungen ergaben, daß die hämolysinbindende Wirkung mit dem steigendem Kohlenstoffgehalt und absteigendem Hydroxylgehalt dieser Stoffe bedeutend zunimmt. Hiebei zeigte das Cholesterin das größte Bindungsvermögen, das etwa 100mal so stark war als das des glykokolsauren und des taurocholsauren Natrons, etwa 10000mal so stark als die des Äthers und etwa 100000mal so stark als die des Äthyls. Ein allgemeines Bild der Cholesterinwirkung mit und ohne Normalserum soll die nächste Tabelle (S. 88) bieten.

Wieder sehen wir in der ersten Kolonne für die einzelnen Extraktabstufungen für sich allein zunächst die lytische Einwirkung und dann eine Hemmungszone. Bei Cholesterinzusatz,

1) Z. f. I. Bd. VII, 1909.

	Alexin (Komplement)	Hbl. mit 4 fachem Ambozeptor	Extrakt X *)	ohne Normalserum		mit Normalserum	
				ohne	mit	ohne	mit
				Cholesterin		Cholesterin	
1	0,1	1,0	0,25	L	cH	fcH	dH
2	0,1	1,0	0,2	L	cH	fcH	sH
3	0,1	1,0	0,15	L	cH	dH	ssH
4	0,1	1,0	0,1	L	cH	sH	ssH
5	0,1	1,0	0,08	sH	cH	ssH	ssH
6	0,1	1,0	0,06	dH	cH	ssH	ssH
7	0,1	1,0	0,04	fcH	cH	L	L
8	0,1	1,0	0,02	fcH	cH	L	L

*) Alkoholischer Luesleberextrakt einer Klinik.

jedoch ohne Serumzusatz, ist die lytische Wirkung verschwunden, und in allen Röhrchen bis zu 0,02 ccm Extrakt herunter Hemmung wahrzunehmen. Wesentlich anders sind die Resultate bei Zusatz von Normalserum. Ohne Cholesterin ist wieder jene Wirkung wahrzunehmen, die wir bereits aus anderen Tabellen kennen; mit Cholesterinzusatz jedoch ist nur insoweit ein Unterschied wahrzunehmen, als eine Abschwächung der Hemmung erkennbar ist. Diese Untersuchungen mit Cholesterin sollen lediglich darauf hinweisen, daß ein Zusatz dieses Stoffes zu Extrakten eine recht gefährliche Sache ist. Viele Autoren haben auch gefunden, daß cholesterisierte Rinderherzextrakte in vereinzelten Fällen unspezifische Hemmungen bewirken. Wir werden später noch darauf zurückkommen.

Eine allgemeine Ausdrucksweise erfordert jedoch hier eine kritische Besprechung. Es ist üblich geworden, von der antikomplementären Kraft bestimmter Stoffe, wie insbesonders von Menschenserum zu sprechen. Der Ausdruck beruht auf der Annahme, daß alle Stoffe, welche die Hämolyse hemmen, das Komplement binden. Schon Arrhenius aber hat hervorgehoben, daß Normalsera wie auch Proteine die Erythrozyten gegen den Angriff von Lysinen verschiedener Art schützen. Auch die bekannten Versuche von Ransom lassen eine derartige Schutzwirkung annehmen. Am deutlichsten scheint diese Wirkung nach unseren Untersuchungen beim Menschenserum einzutreten. Es macht den Eindruck, als wenn das Normalserum vielleicht nach seinem

Gehalt an hydrophilen Kolloiden die Blutkörperchen sowohl vor der Einwirkung des hämolytischen Antiserums wie auch vor der hämotoxischen Kraft der verschiedenen Extrakte zu schützen imstande ist. Nach der Bordet-Gruberschen Theorie der Wirkung des hämolytischen Antiserums auf Blutkörperchen könnte die Schutzwirkung des Serums in dem einen Falle die Beizung der Zellmembran und die Veränderung des Stromas erschwert und in dem andern Falle die Giftkomponente des Extraktes ganz oder teilweise abgehalten werden, direkt auf das Blutkörperchen einzuwirken und es zu zerstören. Eine Wirkung dieser Stoffe direkt auf das Alexin (Komplement) in Form einer Bindung oder Zerstörung scheint nicht einzutreten. Namentlich bei der Verhinderung einer entsprechenden Beizung der Blutkörperchenmembran ist das Alexin nur insoweit in Mitleidenschaft gezogen, als von dem Beizungsgrade der Komplement(Alexin-)bedarf zur kompletten Hämolyse abhängt. Wird nur eine Komplementmenge bereitgestellt, die für das hämolytische System allein ohne die Schutzwirkung eines Serums hinreicht, so kann bei Serumzusatz wegen ungenügender Beizung die Hämolyse ausbleiben. Die Annahme einer antikomplementären Wirkung ist daher nicht ohne weiteres berechtigt.

C. Unsere Methodik.

1. Wahl unserer Methodik.

Bereits in den vorangegangenen Abschnitten wurde bei der Besprechung der einzelnen Reagentien angedeutet, nach welchen Gesichtspunkten eine neue Methode zu gestalten wäre. So ist bereits darauf hingewiesen und begründet, wie wichtig als Medium eine richtig bereitete physiologische Kochsalzlösung ist, und wie auch die Gesamtmenge stets dasselbe Volumen aufweisen muß. Wir wählten gleich den andern Autoren als Gesamtmenge 2,5 ccm; auf die halbe Menge — 1,25 ccm — wird man ausnahmsweise bei zu kleinen verfügbaren Serumdosen heruntergehen können. Die Ablesung der Resultate ist jedoch bei dieser Mindestmenge erschwert. Von diesen Gesamtmengen entfällt der 5. Teil stets auf eine sorgfältig gewaschene 5proz. Hbl.-Körperchenaufschwemmung; für

die Gesamtmenge von 2,5 ccm wird 0,5 ccm der 5proz. Aufschwemmung, für die Gesamtmenge von 1,25 ccm 0,25 hinzugegeben. Die Gesamtmenge bildet daher eine 1proz. Blutaufschwemmung. Hiebei wird besonders betont, daß bei der Bereitung der Blutkörperchenaufschwemmung nach 3- bis 4maliger Waschung stets wieder auf das ursprüngliche Blutvolumen aufgefüllt wird. Mit physiologischer Kochsalzlösung halten sich gut gewaschene Blutaufschwemmungen im Eisschrank 2 bis 3 Tage gut. Große Unregelmäßigkeiten in der Auflösbarkeit konnten wir niemals finden.

Mit der Bemessung der Dosis an hämolytischem Immunserum (Ambozeptor) haben wir uns eingehend beschäftigt. Die Auswertung des Immunserums soll außer mit der herkömmlichen Menge von 0,5 frischen Meerschweinchenserums in der Verdünnung 1 : 10 auch mit 0,1 oder 0.2 ccm erfolgen, um mit geringeren Mengen von Aktivseren die hie und da nicht unbeträchtlichen Mengen von Eigenpräparinen für die Reaktion ungefährlich zu machen. Die Ablesung nahmen wir bei der Immunserumauswertung nach ¾ Stunden vor; dieser Zeittermin genügt für den Aufenthalt im Brutschrank völlig. Jede Zeitersparnis ist für die Durchführung größerer Versuchsreihen wertvoll. Als Gebrauchsdosis nahmen wir die 4fache Menge an Immunserum, die eben noch bei 0,5 ccm Aktivserum gelöst hat, oder falls die Eigenpräparine bei dieser Menge Aktivserum ausnahmsweise völlige Hämolyse bewirkt haben, etwa die doppelte Menge an Immunserum, die bei der Auswertung mit 1,0 oder mit 0,2 Alexin als notwendig gefunden wurde. Nach der festgestellten Gesetzmäßigkeit zwischen Immunserum und Alexin ist die Gebrauchsdosis mit der 4fachen Titermenge bei 0,5 oder die 2fache bei 0,1 oder 0,2 Aktivserum völlig ausreichend, um vollständige und rasche Lyse herbeizuführen, so daß die Ablesung der Resultate in kurzer Zeit erfolgen kann.

Die Wahl der Alexindosis ist, wie wir bereits hervorgehoben haben, von allergrößter Wichtigkeit. Im Gegensatz zu Wassermann, der den hämolytischen Ambozeptor als die einzige Komponente im Reaktionssystem betrachtet, welche schwanken kann, müssen wir das Alexin (Komplement) als in seiner Wirksamkeit

wechselnd bezeichnen, während die Bluteinheit und die Immunserumdosis konstante Faktoren darstellen. Weshalb Wassermann mit 0,5 Alexin, in der Verdünnung 1 : 10 einen beträchtlichen Überschuß gewählt hat, haben wir bereits besprochen. Zugleich wurde auch festgestellt, wie wechselnd dieser Überschuß sein kann; so kann er einmal die 3- bis 4fache Menge des Notwendigen ausmachen, ein andermal überhaupt fehlen. Unter Umständen kann sogar diese Alexinmenge ungenügend sein. Diesen Schwankungen kann nur durch die sorgfältigste Berücksichtigung der Wirksamkeit des jeweiligen Aktivserums mit Berücksichtigung des Einflusses der Extrakt- und Serumzusätze begegnet werden. Bei einigen Methoden, wie z. B. bei der dänischen Methode von Boas, wird vom Komplementtiter ausgegangen und für die Versuchsreihe noch die Extrakteigenhemmung berücksichtigt. Auch andere Autoren, wie Sormani, Alexander gehen in gleicher Weise vor. Sonntag bestimmt gegebenenfalls außer der antikomplementären Wirkung des Extraktes noch gleichzeitig die eines Standardserums. Ausgedehnte Studien über das hämotoxische und hämolytische Verhalten der einzelnen Extrakte haben uns immer mehr erkennen lassen, wie wichtig die Bewertung des Alexintiters, und zwar mit Einrechnung der Extrakt- und Serumeigenhemmung, ist. Dieser so gewonnene Titer erst bildet die gesicherte Grundlage. Sie bildet den verläßlichen Boden für eine richtige Beurteilung der Komplementbindung. Doch muß hiebei noch ein Faktor Berücksichtigung finden und zwar die Eigenhemmung des Patientenserums, die bisher viel zu wenig beachtet wurde. Bei der Feststellung des Alexintiters wird natürlich ein Normalserum verwendet, das mit dem gewöhnlichen Komplementtiter keine oder nur eine Spur einer Eigenhemmung zeigt und gewöhnlich auf die Extrakteigenhemmung einen Einfluß ausübt. In vielen Fällen jedoch und namentlich bei den positiven Seren findet sich eine nicht unbeträchtliche Eigenhemmung. Dieser Faktor ist ein sehr schwankender, und es wäre auch hier verfehlt, ständig mit einem Alexinüberschuß zu arbeiten, der alle Möglichkeiten der Größe dieser Eigenhemmung erschöpft. Auch die Wahl von 0,5 Alexin (Kom-

plement) genügt für diese Möglichkeiten nicht. Daher muß den Tücken des Patientenserums durch eine besondere Serumkontrolle begegnet werden. Wie wir diese Kontrollen anstellen, werden wir demnächst besprechen.

Vom Patientenserum nehmen wir stets 0,1 ccm. Bekanntlich haben manche Autoren, wie insbesondere Kromayer und Trinchese, vorgeschlagen, mit der Serumdosis bis auf 0,4 ccm hinaufzugehen. Es ist nach dem Gesagten verständlich, daß mit einer höheren Serumdosis, in der auch die Eigenhemmung entsprechend erhöht ist, beim Arbeiten mit gleichbleibender Alexindosis (0,5 ccm) häufiger positive Resultate gefunden werden. Die Verläßlichkeit der Methodik ist hierdurch jedoch nicht erhöht, im Gegenteil durch das häufigere Vorkommen eines Überschreitens der Grenze herabgemindert. Die Menge von 0,1 ccm genügt stets und ist völlig ausreichend.

An Extrakt geben wir auch stets 0,1 ccm der jeweiligen Verdünnung, die sich durch unsere besonderen Wertungsmethoden für Extrakte als ausreichend leistungsfähig erwiesen hat. Für die praktische Durchführung des Versuches verlangt Wassermann bekanntlich die Auffüllung jeder Dosis auf 0,5 ccm, so daß durch das Zusammenbringen dieser Dosen die Gesamtmenge von 2,5 ccm sich ergibt. Diese Verdünnungen, namentlich die jedes einzelnen Patientenserums, sind nach unserer Erfahrung lästig und überflüssig. Es genügt, wenn nach dem Einfüllen des Extraktes zunächst sofort die entsprechende Ergänzung an physiologischer Kochsalzlösung kommt, und dann je 0,1 ccm Patientenserum und das erforderliche Aktivserum hinzugegeben werden und nach der Einwirkung dieser 3 Reagentien aufeinander (etwa ½ Sunde im Brutschrank) das hämolytische System hinzugefügt wird. Eine Verschiedenheit der Ansichten besteht auch über den Wert der vorhergehenden Sensibilisierung der Hbl.-Körperchen durch das Immunserum. Die Begründer der Komplementbindungsmethode, Bordet und Gengou, haben bekanntlich eine etwa ½stündige Sensibilisierung im Brutschrank verlangt. Nach der Originalmethode wird die Sensibilisierung dem Zusatz nicht vorausgeschickt; andere Autoren aber, wie Sonntag, Sormani,

sensibilisierten regelmäßig. Nach den Untersuchungen von Eisenberg und Nitsch[1]) ist ein Unterschied mit und ohne Sensibilisierung nicht wahrzunehmen. Wir können dieser Angabe nicht völlig beistimmen. Größere Versuchsreihen mit und ohne Sensibilisierung und zwar unter Berücksichtigung der Reaktionszeiten, haben ergeben, daß ohne vorhergehende Sensibilisierung die Reaktion nicht unbeträchtlich langsamer verläuft. Wir glauben daher die Forderung der Sensibilisierung erneut betonen zu sollen. Zeitverlust ist damit nicht vorhanden.

Von großer Wichtigkeit ist sodann die Frage, ob eine qualitative oder quantitative Bestimmung erforderlich ist. Die Originalmethode begnügt sich mit einem einzigen Hauptversuch. Darin liegt eine Gefahr. Bei etwas ungeübten Arbeitern können nur zu leicht Fehler vorkommen, die ausgedehnten Kontrollen, die die Originalmethode verlangt, bilden dagegen keine Sicherheit. Ob alle diese Kontrollen tatsächlich notwendig sind, werden wir noch erörtern. Eine Methode, die mit Parallelversuchen und Abstufungen arbeitet, muß von vornherein als verläßlicher bezeichnet werden. Durch die Wahl von Abstufungen sind Zufälle in viel höherem Grade ausgeschaltet. Falls die Gesamtzahl der zusammengehörigen Versuche dadurch nicht wesentlich erhöht wird, liegt kein Grund vor, sie nicht anzuwenden.

Für die Abstufungen stehen drei Wege zur Verfügung: Abstufung der Extrakt-, Serum- und Alexinmengen.

Extraktabstufungen in verschieden ausgedehntem Maße sind von verschiedenen Seiten empfohlen worden, so von Kolle, Sormani, Müller und Sonntag. Gründe für die Wahl von Extraktabstufungen sind nicht besonders angeführt. Von einigen Autoren wird betont, daß der Extrakt das am meisten konstante Reagenz darstelle, während das Patienten- und Aktivserum zahlreichen Zufällen und Schwankungen unterworfen seien. Der Annahme einer Konstanz der Extrakte können wir nur bedingt zustimmen. Die Verteilung der hämotoxischen, hämolytischen und Hemmungszone ist allerdings für jedes Extrakt konstant, aber die Gestaltung dieser Zonen ist je nach der Extraktmenge,

[1]) l. c.

und namentlich auch je nach der Menge des im Gemisch vorhandenen Serums wechselnd. Diese Bedenken treffen auch für das Serum zu; hier fällt weniger der Gehalt der einzelnen Sera an Normalpräparinen ins Gewicht, als ihr Einfluß auf den Extrakt und die dadurch bedingte Höhe des Alexinbedarfs für das hämolytische System. Andere Bedenken werden wir noch später hervorheben.

Serumabstufungen werden vielfach angewendet, so bei der dänischen Methode von Boas; auch von Lesser, Klein und anderen sind sie empfohlen. Wir haben schon früher bestimmte Bedenken gegen den Vorschlag, die Serumdosis zu verändern, geäußert. Es kann nicht genug betont werden, daß in dem Untersuchungsgemisch die Extrakt- und Serummengen und damit deren Einwirkung aufeinander stets konstant zu halten sind. Es ist ja richtig, daß bei Verwendung unspezifischer Extrakte, namentlich auch des Lesserschen Ätherextraktes, die Einwirkung von Extrakt und Serum aufeiander verhältnismäßig gering ist. Die spezifischen Extrakte werden jedoch bevorzugt, die durch das Serum in ihren Eigenschaften ungleich stärker beeinflußt werden.

Alle diese Bedenken verweisen auf den dritten Weg, auf die Abstufung des Alexins (Komplements). Unseres Erachtens kommen für diese Abstufung nur Alexindosen in Betracht, welche über das Minimum ansteigen. Es wird die Minimaldosis an Alexin nach Berücksichtigung der Extrakt- und Serumhemmung bestimmt und von dieser Mindestmenge ansteigend, werden höhere Dosen gewählt, um den Umfang der Alexinbindung durch das Extrakt-Serumgemisch besser beurteilen zu können. Wenn bisher nur ausnahmsweise an die Wahl gesteigerter Alexindosen gedacht wurde, so liegen hiefür verschiedene Gründe vor. Zunächst hat man vielfach versucht, von einem bestimmten Alexinüberschuß aus z. B. wie bei der Original Wassermannmethode von 0,5 ccm nach unten abzustufen. In diesem Vorgang liegt eine bestimmte Gefahr. Anderseits wird hervorgehoben, daß mit steigenden Alexinmengen auch der Gehalt an Normalpräparinen zunehme. Diese Gefahr kommt jedoch nicht in Betracht. Auch bei steigenden Alexindosen gelangt man selten über 0,5 ccm der Verdünnung

1 : 10 hinaus; in dieser Menge ist der Gehalt an Normalpräparinen, wie wir bereits hervorgehoben haben, verschwindend klein und um so weniger von Bedeutung, als bei dem vorhandenen Überschuß an Immunserum die spärlichen Präparinmengen ohne Einfluß bleiben müssen. Gegen die Abstufung des Alexins hat früher auch die Annahme der Fermentnatur des Alexins gesprochen. Nach der festgestellten Gesetzmäßigkeit des Verhältnisses von Präparin und Alexin kann das Alexin nicht mehr als Ferment bezeichnet werden. Die Reaktionsverhältnisse sind jetzt völlig geklärt. In Wirklichkeit ist das Alexin selbst der einzige Faktor, der auf die Reaktionsverhältnisse der Reagentien, namentlich des Extrakt- und Patientenserums keinen Einfluß ausübt. Auf diese Reaktionsverhältnisse könnte nur das Meerschweinchenserum, in dem sich das Alexin befindet, einwirken. Dieses Serum übt jedoch, wie wir gesehen haben, einen so geringen Einfluß aus, daß selbst eine Steigerung seiner Menge bis zu 1 ccm in der Verdünnung 1 : 10 die Serumwirkung des Patientenserums nur unwesentlich erhöht. Schließlich ist es naheliegend für eine Komplementbindungsreaktion, zu ermitteln, wieviel Komplement (Alexin) denn gerade durch spezifische Stoffe adsorbiert oder zerstört wird. Durch Abstufungen der Alexinmenge ist die Möglichkeit einer derartigen quantitativen Bestimmung gegeben. Das Ergebnis wird am einfachsten so ausgedrückt, daß jene Alexindosis, die für das hämolytische System einschließlich der Extrakt- und Serumhemmung erforderlich ist, als Alexin-(Komplement-)einheit bezeichnet und angegeben wird, wieviele Alexineinheiten durch das Patientenserum im Maximum verbraucht werden. Wir glauben, daß durch diese Abstufung der Alexinmengen der Syphilisreaktion die sicherste Unterlage gegeben ist.

Gewöhnlich gehen wir derart vor, daß wir, von dem gefundenen Alexintiter ausgehend, als nächste Stufe die 1½fache, als 3. Stufe die doppelte und gegebenen Falles als 4. Stufe die 3fache Titerdose wählen. Selbstverständlich ist entsprechend den steigenden Alexindosen der Zusatz an physiologischer Kochsalzlösung zu vermindern. Das ist eine kleine Unbequemlichkeit gegenüber der Wassermannschen Methode. Diese Unbequemlichkeit weisen

aber alle Methoden mit fallenden oder steigenden Extrakt- und Serummengen auf.

2. Vorversuche und Hauptversuch.

a) Vorversuche.

Die Vorversuche erstrecken sich auf regelmäßige und zeitweilige Feststellungen. Regelmäßig ist vorzunehmen die Überprüfung der hämolytischen Kraft des Immunserums und die Auswertung des Aktivserums, am besten frischen Meerschweinchenserums. Die Titrierung des Immunserums ist bekanntlich eine sehr einfache, vielfach geübte Feststellung, über deren Durchführung weitere Angaben erübrigen. Wir haben bereits darauf hingewiesen, daß der Immunserumtiter mit 0,5 und 0,1 ccm Aktivserum in der Verdünnung 1 : 10 zu bestimmen ist. Um nochmals die Unterschiede, die sich dabei zeigen, zu kennzeichnen, bringen wir folgende Tabellen.

Ambozeptorauswertungen mit normalem Verlauf.

Ambozeptor 0,5 ccm	NaCl	Kompl. 1:10	Hbl.	Ablesung			Kompl. 1:10	Ablesung		
				$^1/_2$	$^3/_4$	1		$^1/_2$	$^3/_4$	1
1:500	1 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm	L	L	L	0,1 ccm	L	L	L
1:1000	1 »	0,5 »	0,5 »	L	L	L	0,1 »	ssH	ssH	L
1:1500	1 »	0,5 »	0,5 »	L	L	L	0,1 »	sH	ssH	ssH
1:2000	1 »	0,5 »	0,5 »	L	L	L	0,1 »	sH	sH	ssH
1:2500	1 »	0,5 »	0,5 »	ssH	L	L	0,1 »	dH	sH	sH
1:3000	1 »	0,5 »	0,5 »	sH	ssH	ssH	0,1 »	fcH	dH	sH
1:3500	1 »	0,5 »	0,5 »	dH	sH	ssH	0,1 »	fcH	fcH	dH
1:4000	1 »	0,5 »	0,5 »	fcH	sH	ssH	0,1 »	fcH	fcH	fcH
1:5000	1 »	0,5 »	0,5 »	fcH	dH	sH	0,1 »	fcH	fcH	fcH
1:6000	1 »	0,5 »	0,5 »	fcH	dH	sH	0,1 »	fcH	fcH	fcH

In der ersten Tabelle wurde ein normaler Befund mit beiden Alexinmengen gewählt, in der zweiten Tabelle ein anormaler, wie er bei Anwesenheit einer größeren Menge von Normalpräparinen im Aktivserum hie und da vorkommt. Der Unterschied in der Höhe des Ambozeptortiters ist beim Normalversuche nach den Ablesezeiten der gewöhnliche: nach ¾ Stunden bei 0,5 Komplement 1 : 2500, bei 0,1 Alexin 1 : 500. In der zweiten Tabelle zeigt

Ambozeptorauswertungen mit anormalem Verlauf..

Ambo-zeptor 0,5 ccm	Kompl. 1:10	Ablesung			Kompl. 1:10	Ablesung		
		$^1/_2$	$^3/_4$	1		$^1/_2$	$^3/_4$	1
1:500	0,5 ccm	L	L	L	0,1 ccm	L	L	L
1:1000	0,5 »	L	L	L	0,1 »	L	L	L
1:1500	0,5 »	L	L	L	0,1 »	ssH	L	L
1:2000	0,5 »	L	L	L	0,1 »	ssH	ssH	L
1:2500	0,5 »	ssH	L	L	0,1 »	sH	ssH	ssH
1:3000	0,5 »	ssH	L	L	0,1 »	sH	ssH	ssH
1:3500	0,5 »	ssH	L	L	0,1 »	sH	sH	ssH
1:4000	0,5 »	ssH	L	L	0,1 »	dH	sH	ssH
1:5000	0,5 »	sH	L	L	0,1 »	fcH	dH	ssH
1:6000	0,5 »	sH	ssH	L	0,1 »	fcH	fcH	sH

sich, daß bei Verwendung von 0,5 ccm Alexin nach ¾ Stunden in der Verdünnung 1 : 5000 doch bereits auch die Lösung vollendet ist, während bei 0,1 Alexin die Grenze bei 1 : 1500 festzustellen ist. Hier bekundet sich der Vorzug der 2fachen Auswertung. Der hohe Gehalt an Normalpräparinen im zweiten Falle hat bei 0,5 Alexin eine Durchlösung zustande gebracht; bei 0,1 Aleüin mit nur dem fünften Teil der früheren Präparinmenge ist eine normale Auswertung gelungen. Es sei ausdrücklich hervorgehoben, daß ein solcher anormaler Gehalt an Normalpräparinen nicht sehr selten auch in Gemischen von 3 bis 5 Meerschweinchenseren zu finden ist.

Die regelmäßige Auswertung des Komplements (Alexins) kann erst nach der Bestimmung des Immunserumtiters vorgenommen werden. Die Zahl der Röhrchen, die für die Abstufungen des Aktivserums gebraucht werden, braucht nicht groß zu sein. Es genügen etwa 6 bis 10 Röhrchen mit 0,4 ccm abwärts bis 0,06 oder 0,04. Wir haben bereits hervorgehoben, daß man die Auswertung des Alexins sowohl mit dem hämolytischen System allein, wie auch nach Zugabe von Normalserum allein, Extrakt allein und Normalserum und Extrakt zusammen regelmäßig vornehmen kann. In der nächsten Tabelle wird eine derartige Auswertung und zwar mit einem spezifischen Extrakt dargestellt.

Komplementauswertungen mit einem spezifischen Extrakt.

	Komplementmenge	0,4	0,3	0,25	0,2	0,15	0,12	0,1	0,08	0,06	0,04	Kontrolle
Kompl. (Alexin) Mischser.	allein . .	L	L	L	L	L	L	L	L	ssH	dH	cH
	mit 0,1 ccm Normalserum .	L	L	L	L	L	L	L	ssH	dH	fcH	cH
	mit 0,1 ccm spezif. Extrakt (1:5) . . .	L	L	L	L	L	sH	sH	dH	dH	fcH	cH
	mit 0,1 ccm spezif. Extrakt (1:5) u. 0,1 ccm Normalserum .	L	L	L	L	L	L	L	ssH	dH	dH	cH

In diesem Falle hat eine Menge von 0,08 Alexin genügt, um das hämolytische System allein bereits nach ½ Stunde zur Lösung zu bringen. In der 2. Reihe, wo dem hämolytischen System 0,1 Normalserum hinzugefügt ist, ist die Lysis erst bei 0,1 eingetreten. In der 3. Reihe ist dem hämolytischen System 0,1 ccm der entsprechenden Extraktverdünnung hinzugefügt. Dieser Zusatz hat noch eine weitergehende Hemmung zustande gebracht; erst das Röhrchen mit 0,15 Alexin zeigt nach ½ Stunde glatte Lösung. In der 4. Reihe ist entsprechend dem Hauptversuche, dem hämolytischen System sowohl 0,1 ccm Normalserum als auch 0,1 ccm der Extraktverdünnung hinzugefügt. Hier zeigt sich die uns bereits bekannte Wirkung des Normalserums auf die Extrakte, indem die hemmende Wirkung des Extraktes aufgehoben erscheint. Die völlige Lysis ist bei derselben Alexinmenge erreicht, die mit Normalserum allein volle Lysis ergeben hat. Diese Komplementmenge von 0,1 ccm nun ist die Titermenge, die im Hauptversuch genommen wird.

Dieses Beispiel zeigt etwa einen mittleren Befund. Häufig ist, wie wir bereits hervorgehoben haben, der Alexintiter auch ohne Serum und Extrazusatz etwas höher, oft geht die Hemmung bei Extraktzusatz weiter herauf. Immer jedoch ist die schützende Wirkung des Normalserums zu bemerken. Für gewöhnlich genügt die Bestimmung des Komplementtiters mit dem Alexin allein und mit Extrakt und Serum gleichzeitig. Der Vollständigkeit

halber wollen wir noch eine weitere Tabelle bringen, in der die Auswertung des Alexintiters mit einem unspezifischen Extrakt zur Darstellung gebracht ist.

Komplementauswertungen mit einem unspezifischen Extrakt.

	Komplementmenge	0,4	0,3	0,25	0,2	0,15	0,12	0,1	0,08	0,06	0,04	Kontrolle
Kompl. (Alexin) Mischser.	allein . . .	L	L	L	L	L	L	L	ssH	sH	fcH	cH
	mit 0,1 ccm Normalserum .	L	L	L	L	L	L	ssH	sH	sH	dH	cH
	mit 0,1 ccm unspez. Extrakt (1:3) . . .	L	L	L	L	L	L	ssH	sH	sH	dH	cH
	mit 0,1 ccm unspez. Extrakt (1:3) u. 0,1 ccm Normalserum .	L	L	L	L	L	L	ssH	sH	dH	fcH	cH

Wir sehen in dieser Tabelle, daß die Wirkung des Normalserums dieselbe ist, wie nach dem früheren Beispiel. Der Zusatz des unspezifischen Extraktes allein hat eine geringe Hemmung bewirkt. Der gleichzeitige Zusatz von Extrakt und Serum ergab dasselbe Resultat, wie der von Serum und Extrakt für sich allein. Der Alexintiter für den Hauptversuch muß daher mit 0,12 ccm angenommen werden. Wie bereits angedeutet, wird gewöhnlich bei der Bestimmung des Alexintiters nur eine Ablesung nach ½ Stunde vorgenommen. Eine Nachlösung nach dieser Frist ist in mäßigem Grade vorhanden, so daß bei der ½stündigen Ablesung ein etwas größerer, aber gleichmäßiger Alexinüberschuß verbürgt ist. Für die kurze Ablesefrist spricht das praktische Bedürfnis, unmittelbar nach der Alexinauswertung gleich mit der Beschickung der Röhrchen der Versuchsreihe beginnen zu können. Durch Einschaltung einer besonderen Extrakt-Normalserum- und Systemkontrolle im Hauptversuche ist Gewähr gegeben, daß der Alexintiter im wesentlichen unverändert geblieben ist.

Zu den zeitweiligen Vorversuchen gehören die Extraktauswertungen. Wir haben schon darauf hingewiesen, daß für die Extraktauswertung neue Richtlinien gefunden werden konnten.

b) Hauptversuch.

Der Hauptversuch gliedert sich in zwei Teile: in die Auswertung der einzelnen Patientensera und in die Kontrollen. Die Anordnung ist aus nachfolgendem Schema (S. 101) ersichtlich.

Als Extrakt wird stets die Menge von 0,1 ccm der entsprechenden Verdünnung eines spezifischen oder unspezifischen Extraktes genommen.

Unmittelbar nachdem die einzelnen Röhrchen mit Extrakt beschickt sind, wird die notwendige Menge physiologischer Kochsalzlösung zugegeben, um mit dem Patientenserum und dem Komplement (Alexin) die Gesamtmenge von 1,5 ccm zu geben. An Patientenserum verwenden wir stetes 0,1 ccm in verläßlich inaktiviertem Zustand. In das 1. Röhrchen gelangt dann die Titermenge Aktivserum, die mit dem jeweiligen Extrakt und Normalserum ermittelt wurde. Die weiteren Röhrchen enthalten die 1½-, 2-, 3- und 4fache Alexintitermenge. Sind diese Manipulationen beendet, so werden die Röhrchen gut geschüttelt und gelangen auf mindestens ½ Stunde in den Brutschrank. Nach Ablauf dieser Frist wird 1 ccm mit dem 4fachen Immunserum etwa ½ Stunde bei Zimmertemperatur sensibilisierten Hbl.-Körperchen zugegeben und nochmals gründlichst durchgeschüttelt. Die Gesamtmenge beträgt nun 2,5 ccm. An Kontrollen werden gleichzeitig angesetzt: 3 Röhrchen für jedes einzelne Menschenserum mit je 0,1 Serum und in gleicher Weise ansteigende Mengen von Alexin, wie in den ersten drei Röhrchen des Hauptversuchs und der erforderlichen Ergänzung an physiologischer Kochsalzlösung. Zur Extrakt-Serumkontrolle, die für eine große Reihe von gleichzeitigen Hauptversuchen gemeinsam sein kann, werden 3 Röhrchen verwendet, und zwar gelangt in das erste die doppelte Extraktmenge, also 0,2 ccm der entsprechenden Verdünnung; ferner in das zweite und dritte die einfache Extraktmenge und in alle 3 Röhrchen je 0,1 ccm Normalserum und in das erste und zweite Röhrchen die einfache Alexintiterdosis, in das dritte die 1½fache. In gleicher Weise gemeinsam für alle gleichzeitig angestellten Hauptversuche ist schließlich die Systemkontrolle, die auch aus 3 Röhrchen besteht. Alle 3 Röhrchen erhalten 1 ccm

Nr.		Extrakt	NaCl-Zusatz auf 1,5 ccm ohne III und IV	Patientenserum	Alexin (Komplement) i. Verd. 1:10	Hbl. 5 proz. mit 4-fachem Imm.-Serum	363		364		365		366		367	
							Ergebnis nach Einwirkung von Stunden (½ Stunde bei 37 % und 1 Stunde bei Zimmertemperatur)									
							½	1	½	1	½	1	½	1	½	1
		ccm	ccm	ccm	ccm	ccm										
Auswertung	1	0,1	1,2	0,1	0,1	1	cH	cH	L	L	fcH	dH	cH	fcH	fcH	dH
	2	0,1	1,15	0,1	0,15	1	cH	cH	L	L	dH	sH	fcH	dH	sH	ssH
	3	0,1	1,1	0,1	0,2	1	cH	cH	L	L	ssH	L	sH	ssH	L	L
	4	0,1	1,0	0,1	0,3	1	cH	cH	L	L	L	L	L	L	L	L
	5	0,1	0,9	0,1	0,4	1	cH	cH	L	L	L	L	L	L	L	L
Serum-Kontrollen	6	—	1,3	0,1	0,1	1	fcH	dH	L	L	fcH	dH	L	L	L	L
	7	—	1,25	0,1	0,15	1	dH	sH	L	L	dH	sH	L	L	L	L
	8	—	1,2	0,1	0,2	1	L	L	L	L	ssH	L	L	L	L	L

Extrakt-Normalserum-Kontrolle

Extrakt	NaCl	Patientenserum	Alexin	Hbl.	½	1
0,2	1,1	0,1	0,1	1	sH	L
0,1	1,2	0,1	0,1	1	L	L
0,1	1,15	0,1	0,15	1	L	L

Systemkontrolle

Hbl.	NaCl	Alexin	½	1
1	1,45	0,05	dH	sH
1	1,4	0,1	L	L
1	1,25	0,15	L	L

der sensibilisierten Hbl.-Körperchen; das erste Röhrchen die halbe Titerdosis des Alexins, das zweite die einfache und das dritte Röhrchen die 1½fache Titerdosis. Die Art dieser beiden Kontrollen ist nach den vorherigen Ausführungen verständlich.

Nach dem Zusatz der sensibilisierten Hbl.-Körperchen gelangen alle Röhrchen des Hauptversuchs und der Kontrollen, nochmals gründlichst durchgeschüttelt, auf ½ Stunde in den Brutschrank. Nach dieser Frist erfolgt die Herausnahme und die provisorische erste Ablesung der Resultate. Die zweite Ablesung kann frühestens bereits nach 1 Stunde bei Zimmertemperatur vorgenommen werden, oder am besten am nächsten Morgen. Nach unseren Erfahrungen ist nach einem ½stündigen Verweilen im Brutschrank der Einwirkungsprozeß nahezu vollendet. Auch andere Autoren nehmen bei ähnlichem Überschuß an Immunserum nach gleich kurzer Zeit die erste Ablesung vor. Von manchen Autoren wird die Forderung erhoben, daß die erste Ablesung erst nach völliger Lysis aller Kontrollen vorgenommen werden darf. Bei unserer Anordnung ist das Abwarten dieses Zeitpunktes nicht notwendig. Die Extrakt-Serum- und Systemkontrolle, von letzterer jedoch nur die beiden Röhrchen mit der einfachen und der 1½fachen Alexintiterdosis, müssen allerdings gelöst sein, aber für die 3 Röhrchen der Serumkontrollen trifft dies keineswegs für alle Seren zu. Das häufige Vorkommen einer Eigenhemmung bei Seren hindert dies. In der Tabelle sind die Befunde in der bei uns üblichen Weise eingezeichnet. Nr. 363 ergab in allen 4 Röhrchen komplette Hemmung (*cH*) der Hämolyse. Die Extrakt-Serum- u. Systemkontrollen sind gelöst, nur im ersten Röhrchen der Systemkontrolle mit der halben Titersosis findet sich noch *sH*, also nicht ganz vollständige Hämolyse. Die Serumkontrollen für das Menschenserum Nr. 363 zeigen im ersten Röhrchen noch starke Hemmung mit *dH*, im zweiten eine schwache Hemmung (*sH*) und erst im dritten Röhrchen völlige Lysis. Dieses Serum hat daher eine Eigenhemmung, die eine halbe Alexineinheit verbraucht hat. Diese halbe Einheit muß nun beim Hauptversuche in Abzug gebracht werden. Da von diesem Serum noch 0,4 Alexin glatt gebunden worden waren, während für das hämolytische System samt Extrakt und Serum

nur 0,1 benötigt wurden, so beträgt diese Mehrbindung, da das letzte Röhrchen noch komplette Hemmung aufweist, mindestens 3½ Alexineinheiten. Bei diesem Serum wurde also die Grenze der Bindung des Alexins nicht erreicht. Um eine vollständige Auswertung bis zu dieser Grenze zu erlangen, müßte mit einer Serumverdünnung 1 : 5 oder 1 : 10 gearbeitet werden. Wir kommen später noch darauf zurück.

Nr. 364. In allen 5 Röhrchen des Hauptversuchs ist auch hier bereits nach ½ Stunde vollständige Lösung, ebenso in den Serumkontrollen. Der Befund ist daher negativ.

Nr. 365. Im 1. Röhrchen ist nach ½ Stunde fast komplette Hemmung (*fc H*) zu finden, nach einer weiteren Stunde noch deutliche Hemmung (*d H*) wahrzunehmen; im 2. Röhrchen sind die Befunde für beide Ablesezeiten *d H* und schwache Hemmung (*sH*) und selbst im 3. Röhrchen ist nach ½ Stunde noch eine Spur einer Hemmung (*ss H*) zu finden, die allerdings nach einer weiteren Stunde geschwunden ist, das 4. und 5. Röhrchen zeigt völlige Lysis. Nun ergibt sich jedoch, daß auch die Serumkontrollen die gleichen Hemmungserscheinungen zeigen. Der Alexinverbrauch ist also hier nicht durch spezifische Stoffe, sondern durch die Eigenhemmung des Patientenserums bewirkt worden. Der Befund ist daher ein negativer.

Nr. 366. In dem 1. Röhrchen ist auch nach der 2. Ablesung noch fast komplette Hemmung (*fc H*) wahrzunehmen; im 2. Röhrchen deutliche Hemmung (*d H*) und auch im 3. Röhrchen noch eine, wenn auch sehr schwache Hemmung (*ss H*). Die Serumkontrollen sind sämtlich wie auch die Extrakt-Serumkontrollen gelöst. Hier ist also eine spezifische Bindung, wenn auch schwächeren Grades wahrzunehmen. Nach der Vorschrift von Wassermann kann eine derartige fast völlig komplette Hemmung bei Lösung aller Kontrollen als ein schwach aber sicher positiver Befund bezeichnet werden.

In der letzten Reihe Nr. 367 zeigt sich ein ähnliches Bild, nur ist im 1. Röhrchen nach der 2. Ableeung nur deutliche Hemmung (*d H*) wahrzunehmen, im 2. Röhrchen nur sehr schwache Hemmung (*ss H*); die übrigen Röhrchen wie die Serumkontrollen sind ge-

löst. Ein derartiger Befund wird nach Wassermann, auch wenn eigentlich eine schwach positive Reaktion dadurch ersichtlich ist, nur als zweifelhaft bezeichnet. Wenn jedoch ein derartiger geringerer Grad von Hemmung bei einem Patientenserum gefunden wird, dessen Lues durch frühere Untersuchungen serologisch festgestellt war, so kann der Befund auch nach Wassermann als positiv bezeichnet werden. Diese wenigen Beispiele genügen vielleicht, um über die Methodik und die Verwertung derselben Aufschluß zu geben. Von der gleichzeitigen Auswertung alter positiver oder negativer Standardseren sehen wir vollständig ab. Das sind Hilfskrücken, die nur die Schwäche einer Methode verdecken sollen. Die Methodik muß derart aufgebaut sein, daß eine spezifische Bindung an sich und durch die Kontrollen einwandfrei ersichtlich gemacht ist. Wir stehen auch auf dem Standpunkt, daß die Verwendung eines einzigen Extraktes, dessen Leistungsfähigkeit sorgfältig festgestellt und hie und da wieder nachuntersucht wird, völlig genügt. Auch die jetzt so vielfach geübte Verwendung von 2 und sogar 5 und 6 Extrakten ist nur ein Beweis der Unsicherheit. Die verschiedenen Ausfälle der Reaktion eines Serums mit den verschiedenen Extrakten kommen nur durch ungenügende Auswertung derselben, durch Hineingeraten in die lytische Zone der Extrakte usw. zustande.

Eine andere Frage ist es, ob spezifisch luetische Extrakte sicherere Resultate geben als unspezifische Normalorgan-Extrakte. Auf diese wichtige Frage werden wir im nächsten Abschnitt kommen. Vom rein praktischen Standpunkt aus ist noch zu erörtern, ob die Zahl der Röhrchen eine Erschwerung für die Anwendung dieser Methodik in der Praxis bedeutet. Im allgemeinen sehen wir, daß für die Auswertung eines Serums 5 und für die Serumkontrollen 3 Röhrchen, insgesamt also 8 Röhrchen, gebraucht werden. Ist die Serummenge geringer, so wird man auch noch ein genügend verläßliches Resultat erhalten können, wenn man die Auswertung auf 3 und die Serumkontrollen auf 2 Röhrchen beschränkt, insgesamt also 5 Röhrchen ansetzt. Ein Nachteil besteht bei dieser Anordnung nur insoweit, als die Grenze der Serumeigenhemmung öfter nicht erreicht, oder auch die Zahl der zweifelhaften Resul-

tate etwas größer wird. Dieser Übelstand ist jedoch nicht so groß. Ist die Serummenge sehr klein, so kann allenfalls auch mit der halben Gesamtmenge bzw. mit den halben Mengen aller einzelnen Agentien gearbeitet werden und zwar so, daß für die Auswertung 3, für die Serumkontrollen 2 Röhrchen Verwendung finden. Bei dieser Anordnung genügen 0,25 Patientenserum für 5 Röhrchen mit je 0,05 ccm statt 0,5 bei dem abgekürzten Normalverfahren und 0,8 ccm Patientenserum bei dem völlig normalen Verfahren. Die Ablesung der Resultate ist allerdings bei diesen verminderten Mengen etwas schlechter, da die Flüssigkeitssäulen weniger hoch sind, aber bei einiger Übung sind kaum Fehler zu befürchten. Für die Praxis genügt es zumeist, die Frage sicher zu beantworten, ob eine spezifische Bindung vorhanden ist oder nicht und zwar unter den von Wassermann angegebenen Einschränkungen.

Wie wir bei der Besprechung des ersten Serums Nr. 363 sehen konnten, war hier die obere Grenze nicht erreicht. In einem derartigen Fall wird am besten am gleichen oder am nächsten Tag eine nochmalige Auswertung, aber mit einem verdünnten Patientenserum und zwar meist in der Verdünnung 1 : 5 oder 1 : 10 vorgenommen. Dabei muß aber vorerst die Frage beantwortet werden, ob nicht durch die Serumverdünnung die Grundlage des Systems erschüttert wird. Eine Reihe von Versuchen hat nachgewiesen, daß die Menge des Serumzusatzes auf die Höhe des Alexintiters nicht ohne Einfluß ist. Dieser Einfluß ist ungefähr proportional der Serummenge. An der Konstanz des Verhältnisses zwischen Serum und Extrakt muß im allgemeinen stets festgehalten werden. In diesem Falle jedoch, wo ein bereits als stark positiv erkanntes Serum vorliegt, kann ausnahmsweise von diesem konstanten Mengenverhältnis abgegangen werden durch Verwendung einer geringeren Serummenge. Hier handelt es sich ja nur mehr um die Bestimmung der Größe der spezifischen Bindung. Um ganz richtig vorzugehen, sollte man eine nochmalige Alexinauswertung mit einem entsprechend verdünnten Normalserum vornehmen; dann wäre die Korrektur gegeben. Durch eine derartige Auswertung läßt sich feststellen, daß manche Luessera noch in 10facher Verdünnung, selbst in 20facher Verdünnung starke Bindung zeigen, so daß

60 bis 80 Alexineinheiten gebunden werden. Diese Ergebnisse begründen auch die Zweckmäßigkeit der Angabe des Bindungsvermögens in Alexineinheiten, gegenüber der Kreuz-Methode.

Die Anwendung von Alexinabstufungen ist nicht ganz neu. Zeisler[1]) hat bereits im Jahre 1909 vorgeschlagen, durch eine quantitative Bestimmung der Komplementmenge den Hemmungskörpergehalt eines Serums oder einer Spinalflüssigkeit festzustellen. In der Ausführung der an und für sich richtigen Idee machte er jedoch Fehler. Zeisler verwendete nur die 2fache Menge des Immunserumtiters und bestimmte die komplementbindende Kraft der einzelnen Sera mit wechselnden Serum-, Extrakt- und Komplementmengen. Durch diese mannigfachen Abstufungen und Verstärkungen wurde die Methodik überaus kompliziert und so so wenig klar, daß sie keine Nachahmer gefunden hat. Die rein wissenschaftlichen Grundlagen für die Beziehungen der einzelnen Agentien waren damals noch nicht klargestellt.

Noch näher an unsere Methodik kamen Browning und Mc Kenzie[2]). Diese beiden Autoren verwendeten auch absteigende Komplementmengen mit gleichen Dosen Extrakt und Antiserum bis zur gerade lösenden Komplementdosis und bestimmten die Anzahl der hämolytischen Komplementdosen, welche durch das Gemisch von Extrakt und Antikörper verbraucht werden. In Kontrollversuchen werden einerseits der Extrakt, anderseits der Antikörper mit den gleichen absteigenden Komplementmengen digeriert. Der bei diesen Kontrollen erforderliche Komplementverbrauch wird von dem im Hauptversuch sich ergebenden Komplementbedarf in Abzug gebracht. Die Schwächen dieser Methodik sind ohne weiteres ersichtlich. Die Serum- und die Extrakteigenhemmung dürfen nicht summiert werden, da in Wirklichkeit eine derartige Summierung nicht stattfindet, sondern im Gegenteil durch die Serumeinwirkung die Extrakthemmung herabgesetzt wird. Außerdem verwendeten beide Autoren überreichliche Mengen von Extrakt. Tatsächlich finden sie auch recht bedeutende Extrakthemmungen und oft von Tag zu Tag Schwankungen dieser

1) B. kl. W. Nr. 44, 1909.
2) Z. f. I. Bd. II, 1909.

Hemmungswerte. Die Zahl der verwendeten Röhrchen ist bei dieser Methode viel größer als bei uns und dieser Umstand wie die geringere Durchsichtigkeit der Methodik hat vielleicht dazu beigetragen, daß sie scheinbar wenig Anklang gefunden hat. Wir haben sie erst nach völligem Abschluß aller wissenschaftlichen Grundlagen für unsere Methode bei genauer Durchsicht der Literatur ausfindig gemacht.

Schließlich ist noch die Frage zu beantworten, ob und wieweit etwa die Resultate der neuen Versuchstechnik beim selben Serum auseinandergehen. Sehr richtig bemerkt Boas, daß bei der Wassermannschen Reaktion, wo sich so viele wirksame Bestandteile zusammenfinden, a priori anzunehmen sei, daß der Wechsel des Ambozeptors, des Antigens, der Blutkörperchen oder des Komplements recht bedeutende Schwankungen des Resultates hervorrufen müsse.

Vielleicht am wichtigsten ist die Frage, ob die Verwendung verschiedener Meerschweinchensera oder bei verschiedenen Verdünnungen des Komplementserums ein gleicher Verbrauch von KE. mit dem einzelnen Patientenserum zu erreichen sei oder nicht. Unsere Versuche an 16 Seren mit verschiedenen Komplementverdünnungen desselben Serums und 4 Versuche bei Verwendung verschiedener Komplementsera ergaben in 10 Fällen völlige Übereinstimmung hinsichtlich des Komplementverbrauches, in den anderen Fällen geringfügige Unterschiede von höchstens einer Komplementeinheit (KE.) bei stärkeren Seren. Befunde derart, daß etwa in dem einen Falle völlige Lösung, in dem anderen starke Hemmung beobachtet wurde ,ergaben sich niemals. Die Schwankungen sind sehr gering, der mittlere Fehler kaum mit 10 bis 15 Proz. zu bewerten.

Ferner wurden Sera mit verschiedenen Ambozeptoren geprüft. Drei verschiedene Patientensera mit drei verschiedenen Ambozeptoren ausgewertet, ergaben bei Verwendung des 4fachen Ambozeptortiters bei den zwei schwächer positiven Seren völlige Übereinstimmung, bei dem dritten stärkeren Serum kleine Verschiedenheiten bis zu einer KE. bei einem Komplementverbrauch von 5 KE. Auch hier ist daher der Unterschied gering. Weiters

wurden 6 verschiedene Sera mit verschiedenen unspezifischen Antigenen ausgewertet. Von diesen Antigenen wurde genau die halbe, gerade noch keine Eigenhemmung bewirkende Dosis verwendet. Hier ergab sich bei allen 6 Seren sogar völlige Übereinstimmung. Auf die besonderen Schwierigkeiten, vergleichende Untersuchungen mit spezifischen Antigenen anzustellen, werden wir später noch eingehen.

Schließlich wurden 3 Sera mit Hbl.-Körperchen von 3 verschiedenen Hammeln ausgewertet. Auch hier ergaben sich hinsichtlich des Komplementverbrauches ganz geringe Unterschiede. Doch wird für diesen letzteren Vergleich bemerkt, daß die Auflösbarkeit der Hammelblutkörperchen der 3 Hammeln — beurteilt nach den etwas verschiedenen Komplementtitern — etwas verschieden zu sein schien. Hiedurch müssen sich bei der Auswertung der Seren kleine Unterschiede ergeben. Als das Resultat dieser vergleichenden Versuche kann somit bezeichnet werden, daß ähnlich, wie dies Boas für die Methode der abgestuften Serummengen nachgewiesen hat, auch bei unserer Methode der mittlere Fehler bei Verwendung der verschiedenen Faktoren für die Komplementbindung ein verhältnismäßig geringer ist. Wir können sagen, daß die Schwankungen im Resultate, die unter Voraussetzung sorgfältiger quantitativer Arbeit durch Versuchsfehler hervorgerufen werden, für den Ausfall der Reaktion nur eine geringe Rolle spielen. Unsere Methode ist daher auch geeignet, eine Zu- oder Abnahme des Gehaltes an Luesreaginen wie sie durch die Entwicklung des Krankheitsprozesses oder durch eine spezifische Behandlung hervorgerufen werden können, genügend genau zu verfolgen.

D. Vorzüge unserer Methode.

1. Für die Extraktprüfung.

Die Originalmethode wie die große Zahl der verschiedenen Abänderungsvorschläge haben für die Prüfung der Extrakte auf ihre Brauchbarkeit und optimale Wirkung keine gesicherte Grundlage gebracht. Wassermann bestimmt die Gebrauchsdosis eines Extraktes mangels eines objektiven Kennzeichens nur empirisch, ähnlich wie bei der Titrierung eines Diphtherieserums. In

längeren Reihen muß der auszuprüfende Extrakt mit einem bereits seit langem im Gebrauch befindlichen und als gut befundenen Extrakte verglichen werden. Vorerst findet gewöhnlich die Feststellung der sogenannten unterbindenden Dosis des Extraktes statt. Wir haben bereits bestimmte Zweifel gegenüber der Bedeutung einer derartigen Feststellung und gegen die Wahl der halben unterbindenden Dosis für Auswertungen zum Ausdruck gebracht. Nach der Originalvorschrift werden stark hemmende Extrakte gewöhnlich überhaupt nicht ausgewertet; nur bei geringer Eigenhemmung erfolgt eine weitere Prüfung des Extraktes.

Nach Wassermann verfährt man so, daß man zunächst kleinere Extraktabstufungen mit ein und demselben sicher syphilitischen Serum ansetzt und zum Vergleiche dasselbe Serum mit einem oder mehreren praktisch bewährten Extrakten in der gebräuchlichen Dosis gleichzeitig prüft. Durch diese Vergleichung erhält man eine grobe Auswertung und Einstellung. Die feinere Einstellung geschieht dann so, daß man den Extrakt an einer größeren Anzahl, mindestens 100, verschiedener luetischer und nicht luetischer Seren (unter letzteren Sera von verschiedenen Infektionskranken) durch mehrere Wochen hindurch vergleichend mit älteren, bekannten Extrakten prüft. Wichtig sind dabei auch Sera von Syphilitikern, die kurz vorher behandelt wurden und deshalb nur eine schwache Reaktion geben. Dabei hat man sein Augenmerk vor allem darauf zu richten, ob etwa ein vorher sicher als negativ erkanntes Serum mit dem neuen Extrakt positiv reagiert, da unbedingt vermieden werden muß, einen Nichtsyphilitiker als Syphilitiker zu stempeln. Diese Art der Einstellung und Auswertung eines Extraktes ist eine wahre Sysiphusarbeit und gewährt kaum eine Befriedigung. Seitens der Autoren, die mit unspezifischen Extrakten arbeiten, wird darauf verwiesen, daß die Auswertung derselben sich viel einfacher als die der spezifischen gestaltet. So sagt Müller wörtlich: Es genügt, mehrere Herzextrakte mit 2 bis 3 inkomplett reagierenden Luetikern auszuprobieren und eventuell nicht konvenierende Extrakte auszuschalten. Herzextrakte, die mit einem Luesfall quantitativ identische Resultate zeigen, werden nach seinen Erfahrungen

bei Untersuchung der verschiedensten Seren fast völlig gleiche Ausfälle darbieten. Müller konnte nie Herzextrakte finden, die in einem Falle völlig gleich, dagegen in einem andern wesentlich different reagierten. Auch nach den Untersuchungen von Thomsen ist die Wirkung unspezifischer Alkoholextrakte ganz einheitlich. Thomsen untersuchte z. B. 40 Herzextrakte mit demselben Serum und in fallenden Dosen; die Resultate waren völlig parallel. Wegen dieser unter sich übereinstimmenden Wirkung der unspezifischen Alkoholextrakte hält Boas eine Titrierung der Extrakte überhaupt nicht für erforderlich.

So harmlos sind jedoch die Extrakte doch nicht. Für viele Autoren, wie z. B. Meirowski, spielt der Extrakt bei der Ausführung der Reaktion die Rolle eines Dämons. „Es kommt vor, daß der Extrakt bei richtiger Versuchsanordnung an einem Tage hemmend und den andern Tag mehr lösend wirken kann. Gute und brauchbare Extrakte können gelegentlich bei manifester Lues negative Reaktion geben. Jeder Extrakt gibt überhaupt in einem verschiedenen Prozentsatz von Fällen ein positives Resultat.“ Hecht[1]) spricht die Ansicht aus, daß die Unstimmigkeiten bei der Wassermannschen Reaktion weniger in der Methode, als in der Wertigkeit des als Antigen gebrauchten Extraktes liege. Wenn man steigende Dosen eines Extraktes — so sagt Hecht — auf ihre Wirksamkeit bei der Serumreaktion der Syphilis prüft, dann zeigt es sich, daß ganz geringe Mengen überhaupt nicht, auch nicht bei florider Lues, hemmen. Mit steigenden Mengen tritt bei Luetikern immer häufiger Hemmung auf; es reagieren auch latent luetische positiv. Bei Vermehrung der Menge bemerkt man dann, daß auch andere nicht luetische Kranke Hemmung zeigen; geht man noch weiter, hemmen auch Gesunde und schließlich gelangt man zu einer Dosis, die allein das ganze zugesetzte Komplement bindet. Nach Hechts Ansicht ist die Wassermannsche Reaktion nur in einer bestimmten Reaktionsbreite des Extraktes für Syphilis spezifisch. In einer graphischen Darstellung hat Hecht diese Zoneneinteilung vorgeführt, nach der für seine Extrakte die klinische spezifische Dosis nur zwischen

1) D. med. W. Nr. 20. 1911.

0,1 und 0,4 ccm liegt. Eine ähnliche Zoneneinteilung hat auch Nielsen-Geyer[1]) angegeben. So schön diese Zoneneinteilung erscheint, steht sie doch mit der genaueren Kenntnis der Extraktwirkungen in Widerspruch. Wir haben in einem früheren Abschnitt bereits von Zonen gesprochen, die bei der Einwirkung des Extraktes auf Blutkörperchen allein wahrzunehmen sind und zugleich erörtert, welche Zusätze die Lagerung dieser Zonen verändern. Zugleich haben wir gefunden, daß für die Verwendung der Extrakte der Begriff der eigenhemmenden unterbindenden Dosis zu beseitigen ist. Notwendig ist lediglich, die reine Extraktwirkung auf Blutkörperchen festzustellen und zu bestimmen, wie weit die eiweißfällende bzw. die lytische und manchmal auch die Hemmungszone reicht. Die Vorwertung der Extrakte wird daher sich anders vollziehen müssen, als wie dies Wassermann und mit ihm andere angegeben haben. Auch Hecht bestimmt trotz seiner Zoneneinteilung mit dem gewöhnlichen Komplementüberschuß die Grenze der Eigenhemmung und verwendet dann die Hälfte derjenigen Menge, die noch deutliche Eigenhemmung gezeigt hat.

Unsere Vorwertung der einzelnen Extrakte gestaltet sich, nachdem wir durch ausgedehnte Versuche gesehen haben, daß selbst die Verwendung des Alexintiters allein keinen völligen Einblick gewährt, folgendermaßen: Jeder neue Extrakt wird in abgestuften Mengen zunächst ohne irgendwelchen Zusatz, dann unter Serumzusatz mit sensibilisierten Blutkörperchen in Berührung gebracht. In weiteren Reihen erfolgt der Zusatz einer Menge Aktivserum, die zur Komplettierung des hämolytischen Systems ausreicht, und zwar ohne und mit Normalserum, und schließlich eine ähnliche Reihe, aber nicht mit Normalserum, sondern mit einem sicher positiven Serum. Wir haben diese Versuchsanordnung für zwei Beispiele und zwar für einen spezifischen Lues-Leberextrakt und für einen unspezifischen Ochsenherz-Extrakt in der nächsten Tabelle (S. 112) zur Darstellung gebracht. Die Versuchsanordnung ist wieder wie gewöhnlich. Mit den Extraktmengen sind wir diesmal nicht höher als bis 0,6 ccm gegangen, haben dann jedoch Abstufungen eingeschaltet bis 0,0001 ccm.

1) D. med. W. Nr. 29, 1912.

Vorwertung.

	Gesamtmenge 2,5 ccm Hbl. 0,5 ccm der 5 proz. Aufschwemmung sensibilisiert mit dem 4fachen Ambozeptor	Extraktabstufungen in ccm									
		0,6	0,4	0,2	0,1	0,07	0,04	0,01	0,005	0,001	0,0001
	A. Alkoholischer spezifischer Extrakt. Von der Firma Gans Nr. 45. Titerangabe: 0,07.										
I	Alkoholischer Extrakt ohne Alexin und Serum	dH (EF)	sH (EF)	L	L	cH	cH	cH	cH	cH	cH
II	Alkoholischer Extrakt ohne Alexin mit 0,1 ccm Normalserum	ssH (EF)	L	fcH (trüb)	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH
III	Alkoholischer Extrakt mit Alexintiter, ohne Serum	sH (EF)	ssH (EF)	L	L	L	L	L	L	L	L
IV	Alkoholischer Extrakt mit Alexintiter und Normalserum	ssH (EF)	Spur trüb	L	L	L	L	L	L	L	L
V	Alkoholischer Extrakt mit Alexintiter und 0,1 ccm positivem Serum	sH (EF)	Spur trüb	fcH	cH	cH	cH	cH	cH	dH	L
	B. Unspezifischer Rinderherz-Extrakt.										
I	Alkoholischer Extrakt ohne Alexin und Serum	dH (EF)	L gelb	cH gelb	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH
II	Alkoholischer Extrakt ohne Alexin mit 0,1 ccm Normalserum	Spur trüb	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH	cH
III	Alkoholischer Extrakt mit Alexintiter, ohne Serum	ssH trüb gelb	L gelb	L	L	L	L	L	L	L	L
IV	Alkoholischer Extrakt mit Alexintiter und Normalserum	Spur trüb rötlich	sH	L	L	L	L	L	L	L	L
V	Alkoholischer Extrakt mit Alexintiter und 0,1 ccm positivem Serum	Spur trüb rot	fcH	fcH	dH	dH	dH	sH	sH	L	L

In der Reihe I ist wieder die reine Wirkung des alkoholischen Extraktes auf die Blutkörperchen zu sehen: zuerst Eiweißfällungs-, dann lytische, dann unbeeinflußte Zone. In Reihe II ist die Veränderung durch den Serumzusatz zu erkennen, die Reihe III zeigt trotz des Zusatzes von Aktivserum völlige Übereinstimmung mit der Reihe I. Besonders wichtig ist, daß eine Hemmungszone nach der lytischen Zone bei diesem Extrakt und auch bei dem unspezifischen Extrakt nicht wahrzunehmen ist. Der Zusatz an Normalserum in Reihe IV bewirkt die übliche Veränderung der Eiweißfällungszone bei Übereinstimmung mit Reihe II. Als besonders charakteristisch ist dann die Reihe V mit dem positiven Serum zu bezeichnen. Die spezifische Bindung durch die Reaktionskörper tritt auf diese Weise rein abgehoben von den andern Wirkungen in die Erscheinung. Die Eiweißfällungszone in den beiden Röhrchen mit 0,6 und 0,4 Extrakt ist ziemlich unverändert, in der lytischen Zone ist ansteigend eine zunehmende Hemmung der Hämolyse wahrzunehmen, bis etwa von 0,1 Extrakt an die reine Bindungswirkung unvermindert bis 0,005 ccm in die Erscheinung tritt. Ein ähnliches Bild bietet auch der untere Teil der Tabelle mit dem unspezifischen Extrakt. Auch hier ist in der Reihe V zunächst im Röhrchen mit 0,6 Extrakt noch eine Spur Eiweißfällung zu bemerken, an Stelle der lytischen Zone tritt die spezifische Hemmung, und zwar bis zum Röhrchen mit 0,2 Extrakt in gleicher Höhe, dann allmählich abnehmend. Eine derartige Vorwertung gibt also einen viel besseren Einblick in das Wesen und in die Wirkung des einzelnen Extraktes wie die früher angegebenen Vorversuche. Ein bestimmter Anhaltspunkt ist nunmehr bereits gegeben; die Grenze der lytischen Wirkung, und wenn vorhanden, auch die der spezifischen Hemmungswirkung, kann durch diese Versuchsanordnung klargestellt werden. Es erübrigt nur mehr ein weiterer Versuch, um die volle Leistungsfähigkeit des Extraktes an einem positiven Serum festzustellen, kurz, seinen Empfindlichkeitswert zu ermitteln. Für eine derartige Bestimmung bietet unsere Methode mit den abgestuften Alexinmengen ganz besondere Vorzüge. Die Art der Durchführung ist aus der nächsten Tabelle (S. 114) ersichtlich.

Hauptwertung.

	Gesamtmenge 2,5 ccm	A. Mit 0,1 ccm positivem Serum							B. Mit 0,1 ccm Normalserum						
	Hbl. 0,5 ccm der 5 proz. Aufschwemmung, sensibilisiert mit dem 4 fachen Ambozeptor	Extraktabstufungen in ccm													
	Aktivserum 1:10 vom Titer an	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,001	0,0001	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,001	0,0001
	A. Alkoholischer spezifischer Extrakt. Von Gans Nr. 45.														
I	0,2 ccm	cH	cH	cH	cH	cH	fcH	ssH	L	L	L	L	L	L	L
II	0,3 »	cH	cH	cH	cH	cH	ssH	L	L	L	L	L	L	L	L
III	0,4 »	cH	cH	cH	cH	fcH	L	L	L	L	L	L	L	L	L
IV	0,6 »	cH	cH	cH	cH	sH	L	L	L	L	L	L	L	L	L

	Gesamtmenge 2,5 ccm	Mit 0,1 ccm positivem Serum						
	Hbl. 0,5 ccm der 5 proz. Aufschwemmung, sensibilisiert mit dem 4 fachen Ambozeptor	Extraktabstufungen in ccm						
	Aktivserum 1:10 vom Titer an	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,001	0,0001
	B. Unspezifischer Rinderherz-Extrakt.							
I	0,2 ccm	cH	cH	fcH	sH	sH	sH	ssH
II	0,3 »	cH	dH	ssH	ssH	ssH	ssH	L
III	0,4 »	cH	sH	L	L	L	L	L
IV	0,6 »	cH	L	L	L	L	L	L

Wir haben wieder im oberen Teil der Tabelle einen alkoholischen Luesleber-Extrakt, im untern Teil einen unspezifischen Rinderherz-Extrakt. Es sind dieselben Extrakte wie bei der Vorwertung. Beide Reihen wurden gleichzeitig durchgeführt. Bei einer derartigen Hauptwertung eines Extraktes sind stets 2 Versuchsreihen vorzunehmen: Die eine mit einem positiven Serum und die andere mit 0,1 ccm eines Normalserums. Das Normalserum muß natürlich in seiner Wirkung auf den Alexintiter geprüft, d. h. der Alexintiter mit Einrechnung der Hemmungswirkung des Serums festgestellt sein. Als Abstufungen des Alexins sind hier neben der Titerdosis von 0,2 ccm, die 1½fache, 2fache und 3fache Titermenge genommen. Die Extraktabstufungen gingen von 0,1 bis 0,0001 herunter. Größere Mengen an Extrakt sind nicht notwendig, da wir ja aus der Vorwertung wissen, daß 0,1 ccm beider Extrakte bei Serumzusatz keine lytische Wirkung mehr erkennen lassen. Die Unterschiede bei den einzelnen Extraktabstufungen treten klar zutage. Noch eine Menge von 0,01 ccm spezifisches Extrakt bindet 3 Alexintitereinheiten, erst bei noch kleineren Mengen erfolgt rasche Abnahme der Leistungsfähigkeit. Die Kontrollen mit Normalserum zeigen, wie dies beim richtigen Versuch sein muß, völlige Lysis. Es ergibt sich daher für den spezifischen Luesleber-Extrakt, daß er eine vollständige und reine Wirkung bis zur Menge von 0,01 ccm herab aufweist. Als Gebrauchsdosis wird man in diesem Falle in Übereinstimmung mit der Vorwertung die Extraktmenge von 0,01 ccm annnehmen können. Der Extrakt ist also in der Verdünnung 1 : 10 zu verwenden. Ein ähnliches Bild zeigt der untere Teil der Tabelle mit dem unspezifischen Extrakt. Hier ist aber nur mit der Menge von 0,1 ccm Extrakt eine volle Leistung zu erreichen. Die Gebrauchsdosis für den unspezifischen Extrakt wäre daher mit der Menge von 0,1 ccm anzusetzen. Dieser Wert stimmt auch mit der Vorwertung ziemlich überein.

In dieser und ähnlicher Weise haben wir eine große Zahl, und zwar über 50 Extrakte verschiedenster Herkunft, meist Extrakte, die in verschiedenen Kliniken oder Instituten zur Verwendung standen, ausgewertet und mit unseren Extrakten in den gefundenen Ge-

brauchsdosen zu vergleichenden Untersuchungen verwendet. Wir glauben, bei dieser Art der Vor- und Hauptwertung eine weitgehende Einsicht in die Wirkung spezifischer und unspezifischer Extrakte gewonnen zu haben. Vielfach stimmten die angegebenen Gebrauchsdosen mit den derartig ermittelten Gebrauchswerten nicht überein. Unter anderem hatten wir Gelegenheit, 6 spezifische akoholische Extrakte, welche die Militärärztliche Akademie in München von der Kaiser-Wilhelms-Akademie bezogen hatte, genau auszuwerten. Die Gebrauchsdosen waren bei diesen Extrakten zu ein Bruchteil genau einmal mit 0,07, je zweimal mit 0,08 und 0,09 und einmal mit 0,11 angegeben. Unsere Auswertungen ergaben, daß diese Extrakte durchwegs eine eiweißfällende und lytische, aber nicht immer eine Hemmungszone aufwiesen. Die Gebrauchsdosen stimmten nur bei 2 Extrakten annähernd mit den angegebenen überein; 1 Extrakt konnte man mit den gleichen Mengen mit Kochsalzlösung, 2 andere im Verhältnis 1:4 und 2 im Verhältnis 1:10 mit ClNa verdünnen, ohne eine Verminderung der Leistungsfähigkeit befürchten zu müssen. Zumeist können die alkoholischen und spezifischen Extrakte ohne Schaden recht beträchtlich verdünnt werden. Wir haben wiederholt Extrakte gefunden, die selbst in der Verdünnung 1 : 20 noch volle Wirksamkeit zeigten. Für die Praxis ist diese Tatsache überaus wichtig. Nach der alten Wassermannschen Vorschrift würden Extrakte, die in der Menge von 0,1 ccm bei Verwendung eines Komplementüberschusses von 0,5 ccm der Verdünnung 1 : 10 noch eine Hemmung zeigten, überhaupt nicht weiter verwendet. Gerade solche Extrakte nun zeigen zumeist, selbst in weitgehender Verdünnung, eine ausgezeichnete und völlig gleichmäßige Wirksamkeit; sie müssen nur richtig ausgewertet werden. In Anbetracht der Knappheit namentlich luetischer Extrakte ist es nicht gleichgültig, ob man einen mit schwerer Mühe gewonnenen Extrakt wegen eines Vorurteils wegwirft oder ihn monatelang mit dem besten Erfolge verwenden kann. Unspezifische Extrakte müssen im allgemeinen in geringerer Verdünnung oder unverdünnt zur Verwendung kommen, da sie zumeist in den gewöhnlichen Abstufungen nur eine minimale Eiweißfällungszone bzw. lytische Zone haben. Nebenbei

bemerkt, hat die Feststellung der Wirkungszonen für die Extrakte auch eine sonderbare Erscheinung aufgeklärt. Elias, Neubauer, Salomon und Porges[1]) und mit ihnen auch andere haben gefunden, daß manchmal bei Steigerung der Menge des Extraktes oder auch des Serums eine positive Reaktion ins Negative umschlägt oder zumindest schwächer wird. Diese Erscheinung ist sehr einfach zu deuten. Bei Verwendung größerer Extraktmengen gelangt man leicht in die lytische Zone, und dann kann die lytische Kraft mehr oder weniger durchschlagen. Bei unseren Extraktauswertungen konnten wir gerade bei wirksamen Extrakten oft feststellen, daß die Menge von 0,1 ccm unverdünnt mit einem positiven Serum glatt Lysis oder sogar noch Eiweißfällung ergibt, während die nächst niederen Abstufungen die hemmende Wirksamkeit des Extraktes deutlich erkennen lassen.

Es lag nahe, daß wir auf diesen gesicherten Unterlagen daran gingen, nochmals die Frage zu untersuchen, ob die spezifischen Extrakte tatsächlich noch spezifische Stoffe durch Bindung anzeigen, wo unspezifische Extrakte versagen. Bei Versuchen zur Entscheidung dieser Frage muß man von sorgfältigst ermittelten Gebrauchsdosen für beide Extrakte ausgehen. Nach dieser Richtung hat z. B. in einer neuerlichen Veröffentlichung Jaiser[2]) eine irrtümliche Angabe gemacht. Jaiser hat eine Reihe vergleichender Versuche mit wässerigen und alkoholischen und in bestimmter Weise umgearbeiteten Extrakten gemacht und hiebei auch den sogenannten Sensibilitätswert von Extrakten derart bestimmt, daß er bei gleichen Extraktmengen fallende Mengen eines luetischen Serums verwendete. Er fand, daß spezifische Extrakte bis zu viel weiteren Serumverdünnungen herab Hemmungen zeigen als Normalorganextrakte, und schließt nun auf eine weitgehende Überlegenheit der ersteren. Diese Schlußfolgerung ist bei gleichen Extraktmengen nicht berechtigt. Spezifische Extrakte geben natürlich viel weiterreichende Hemmungen, aber die Zonenverteilung ist eine andere wie bei unspezifischen Extrakten. Man könnte nach diesen Versuchen lediglich sagen, daß spezifische

1) Wiener kl. W. 1908, Nr. 21.
2) Z. f. I. Bd. XXIV, Heft 6, 1916.

Extrakte weiter verdünnt werden können, um noch gleiche Wirkung zu zeigen wie unspezifische Extrakte, aber nicht mehr. Die Frage selbst, ob spezifische oder unspezifische Extrakte bei richtiger Gebrauchsdosis in schwach positiven Seren Unterschiede zeigen, ist damit noch nicht beantwortet. Wir haben bei 1823 Seren mit richtig bestimmten Gebrauchsdosen spezifischer und unspezifischer Extrakte vergleichende Untersuchungen angestellt und hiebei gefunden, daß unter rund 20 Proz. positiven Fällen annähernd die Hälfte (187) mit den unspezifischen Extrakten schwächere Reaktion gaben, zum Teil sogar völlig versagten, während sie nur in 19 Fällen mit den unspezifischen Extrakten stärker reagierten. Einige Beispiele enthält die nächste Tabelle.

Auswertungen mit spezifischen und unspezifischen Extrakten.
a = unspezifischer Extrakt, b = spezifischer Extrakt.

KE. oder AE.	Tabes		Arthritis		Papeln Lues II.		Ikterus		Lues		Keratitis parenchym		Lues lat.		Arterio-sklerose	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
1	L	cH	dH	cH	sH	cH	fcH	cH	L	fcH	fcH	cH	dH	cH	L	fcH
$1^1/_2$	L	cH	ssH	cH	L	cH	dH	cH	L	dH	sH	cH	ssH	cH	L	dH
2	L	cH	ssH	cH	L	cH	dH	cH	L	ssH	ssH	cH	L	fcH	L	ssH
3	L	cH	—	fcH	—	—	—	—	L	ssH	L	fcH	—	—	—	—

Fast alle Fälle, in denen das unspezifische Extrakt versagte, waren sichere Luesfälle. Eine bestimmte Krankheitsform herrschte nicht vor. Das Ergebnis als solches ist nicht ohne Bedeutung. Vielleicht ist doch die alte Annahme Wassermanns richtig, daß in den spezifischen Extrakten ein eigentliches Antigen vorhanden ist. Die Überlegenheit der spezifischen Extrakte kann nach diesen ausgedehnten Vergleichsversuchen jedenfalls nicht bezweifelt werden.

Unsere vergleichenden Versuche konnten anderseits die Angaben von Seligmann und Blume[1]) nicht bestätigen, wonach mit Rücksicht auf die verschiedene Wirkung der einzelnen Extrakte immer mit einer größeren Zahl von Extrakten gearbeitet werden müsse. So haben Seligmann und Blume z. B. im Früh-

1) Berl. kl. W. 1909.

stadium der Lues bei 50 Proz. der Seren mit allen Extrakten positive Reaktionen erhalten, bei 33 Proz. mit einem und bei 17 Proz. mit keinem Extrakt. Auch bei anderen Luesformen war mit etwa 10 Proz. der untersuchten Seren stets nur mit einem Extrakt durchwegs schwach positive Reaktion zu erzielen. Seligmann und Blume schließen aus diesen Ergebnissen, daß es im Frühstadium der Syphilis einen Zustand des Serums geben müsse, in dem es wohl mit dem einen oder andern Extrakt schon Hemmungsreaktionen gibt, aber noch nicht mit allen. Diese Untersuchungen von Seligmann und Blume haben Veranlassung dazu gegeben, daß nunmehr ganz allgemein mit mehreren Extrakten, oft sogar mit 5 bis 6 Extrakten gearbeitet wird. Auch Wassermann schreibt die Verwendung mehrerer Extrakte vor. Unseres Erachtens liegen die Unterschiede in der ungenauen Feststellung der richtigen Gebrauchsdosis. Bei der bisherigen, rein schätzenden Einstellung der Extrakte gerät man vielfach in die noch lytische oder Hemmungszone, oder man nahm eine Menge, die wohl spezifische Wirkung, aber nicht mehr die höchste Leistungsfähigkeit darstellt. Es ist klar, daß sich bei einer derartigen schwankenden Grundlage für die einzelnen Extrakte auch Schwankungen in den Befunden ergeben müssen. Bei unseren Extrakten finden wir solche Unterschiede im Verhalten so gut wie gar nicht; und es kann ruhig gesagt werden, daß nach der erfolgten Klarstellung fast aller Beziehungen der Faktoren der Syphilis-Serumdiagnostik die Verwendung eines richtig ausgewerteten spezifischen Extraktes völlig genügt, um einwandfreie Resultate zu erhalten. Die Verwendung vieler Extrakte ist bei schlechter Auswertung doch keine Gewähr, sondern gibt nur Anlaß zu fortwährenden Zweifeln. Bei richtiger Auswertung jedoch ergeben sich übereinstimmende Resultate, so daß verläßlich mit einem Extrakt gearbeitet werden kann.

Die Extrakte sind überhaupt als Reagenzien keineswegs so schwankend, als man vielfach annahm. Sie haben allerdings Wirkungen auf die Blutkörperchen; aber in Mengen, in denen diese Wirkungen nicht mehr vorhanden sind, zeigen sie große Konstanz der Wirkung. Auch sind namentlich alkoholische Extrakte Jahre

hindurch gut haltbar. Wir selbst haben Extrakte Monate hindurch benützt und bei sorgfältiger Behandlung keine Abnahme der Wirksamkeit nach verschiedenen Auswertungen wahrnehmen können. An vielen Kliniken werden Extrakte Jahre hindurch benützt, ohne schlechter zu werden. Diese Erfahrung deckt sich mit der Angabe von Eisenberg und Nitsch[1]). Auch diese Autoren konnten Monate hindurch eine unverminderte Reaktionsfähigkeit der verschiedenen Extrakte feststellen. Schließlich wollen wir jetzt bereits bemerken, daß die oft geäußerte Forderung nach staatlicher Prüfung der Extrakte, ebenso wie für Heilsera, im allgemeinen wohl berechtigt ist, aber selbst die einheitliche Prüfung an einer besondern Stelle genügt an und für sich nicht, um Irrtümer zu vermeiden.

2. Für die Beurteilung des Patientenserums.

Es wurde bereits bei der allgemeinen Besprechung des Patientenserums darauf hingewiesen, daß nach der Ansicht einer Reihe von Autoren, namentlich von Bauer, Hecht und Müller, jedes Menschenserum an sich stark hemmende Eigenschaften besitzt. Hecht hat auch die Größe dieser Eigenhemmung bei Seren gesunder und luetisch infizierter Menschen untersucht und hiebei graduelle Unterschiede gefunden. Von diesen Autoren wurde auch bereits betont, daß der Gehalt einzelner Sera an Normalpräparinen diese Erscheinung vielfach versteckt. Dieser Präparingehalt kommt trotzdem nach Müller bei Verwendung eines regelmäßigen größeren Überschusses an Immunserum für das Zutagetreten der Eigenhemmung kaum in Betracht. Trotz dieser Klärung sind in der Literatur noch vielfach eigentümliche Angaben zu finden. So führt Wassermann an, daß es bei einer einfachen Serumdosis (0,1 ccm) leichter zu Eigenhemmung komme als bei der doppelten, weil in letzterer infolge des Gehaltes des Menschenserums an Normalambozeptoren (Normalpräparinen) für Hammelblutkörperchen ein stärkerer Ambozeptorüberschuß vorhanden sei. Entsprechend dieser Auffassung wird nach der

1) Z. f. I. Bd. IV, 1910.

strengen Originalmethode für die Serumkontrolle stets das doppelte der Versuchsserumdosis genommen.

Im dänischen Statens Institut hingegen begnügt man sich für die Serumkontrolle mit der einfachen Serumdosis.

Dort wird bei der Serumkontrolle außerdem auch nur die eben totallösende Komplementmenge verwendet, so daß nach dortiger Auffassung bereits geringe Eigenhemmungen der Seren nachgewiesen werden können. Nach den Erfahrungen von Boas ist es nicht sehr häufig, daß das Serum selbst hemmt. Was mit diesen angeblich seltenen eigenhemmenden Seren geschieht, ob diese Sera ausgeschaltet werden oder die Eigenhemmung bei der Abstufung der Serummengen Berücksichtigung findet, ist an keiner Stelle der Schrift von Boas angegeben. Aus welchem Grunde bei der Original Wassermann-Methode die Eigenhemmung der Sera keine Rolle spielt, werden wir noch besonders erörtern.

Neue Gesichtspunkte bringt Müller mit der Besprechung der Bedeutung der Eigenhemmung bei aktiven Seren. Müller gibt an, daß sich bei normalempfindlichem Komplement ungefähr bei 3,5 Proz. der Sera im Aktivzustand Eigenhemmung zeige, so daß bei der Serumkontrolle ohne Antigen eine mehr oder minder große Blutkörperchenmenge ungelöst bleibt. Selten wird, wie Müller angibt, das Komplement vollständig gebunden. Aber es genügt auch eine inkomplette Eigenhemmung, um die Sicherheit der Diagnose zu gefährden. Es zeigt sich nun allerdings, daß es meist luetische Seren sind, die neben positiver Reaktion auch Eigenhemmung zeigen. Müller erwähnt, daß es Autoren gebe, die schon dieser Eigenhemmung luetischer Sera einen diagnostischen Wert zuschreiben. Er erklärt aber diese Auffassung als eine Überschätzung des Befundes, da es genug nichtluetische Sera mit Eigenhemmung gebe und so manche Luessera diese Eigenschaft nicht zeigen. Aus der Erscheinung der Eigenhemmung der Sera zieht Müller folgende praktische Folgerungen: Wird Eigenhemmung im Aktivserum gefunden, so wird der Versuch nach Inaktivierung des Serums wiederholt. Ergibt sich im inaktivierten Serum keine Eigenhemmung, so diagnostiziert Müller selbst bei unzweifelhaft po-

sitivem Befunde nach Wassermann nicht mit absoluter Sicherheit Lues, sondern bezeichnet den Ausfall als einen zweifelhaften. Diese Vorsicht sei deshalb am Platze, weil starke Eigenhemmung des Serums nur im Aktivzustande die Begleiterscheinung einer unspezifischen Reaktion sein könne. Findet sich auch im inaktivierten Zustande Eigenhemmung, dann stellt Müller die Diagnose Lues überhaupt nicht. Ein Herabgehen mit der Serumdosis bis zum Schwinden der Eigenhemmung, wie dies manche Autoren vorschlagen, verwirft er, da es eine Selbsttäuschung sei.

In den letzten Monaten hat M. Hesse die Bedeutung der Eigenhemmung der Blutseren für die Syphilisdiagnostik in einer besonderen Erörterung behandelt. Hesse nimmt an, daß die Eigenhemmung der Sera keineswegs eine sehr seltene und unbedeutende, lediglich störende Eigenschaft der Sera sei, sondern vielmehr eine regelmäßige Eigenschaft der positiv reagierenden Sera. Er findet, daß die Eigenhemmung nach der Original-Wassermann-Methode nicht nachgewiesen werden kann und schlägt zu deren Nachweis eine besondere Methode vor. Im wesentlichen wird hiebei die gerade noch lösende Komplement- und Ambozeptormenge mit Patientenserum in steigenden Mengen von 3 bis 6 Tropfen (Tropftechnik) verwendet. Hesse nimmt also keinen Ambozeptorüberschuß und eine besonders hohe Menge von Serum bis zu 0,3 ccm (6 Tropfen) bei einem Gesamtvolumen von 1,45 ccm. Nach den Angaben von Hesse fielen auf 160 Untersuchungen 132 mit dem Ergebnis der Wassermannschen Reaktion gleichsinnig aus, 5 waren bei Hesses Methode negativ trotz positivem Wassermann, und in 4 Fällen war das Umgekehrte der Fall. Als störend empfand Hesse in 19 Fällen den Gehalt an Normalambozeptoren. Wie bereits erwähnt, glaubt Hesse durch die Bestimmung der Eigenhemmung nach seiner Methode die positiven von den negativen Seren im allgemeinen genau unterscheiden zu können. Dieser Auffassung von Hesse ist bereits Müller[1]) entgegengetreten. Müller findet, daß offenbar ein

1) Wiener kl. W. Nr. 39 1916.

ziemlicher Prozentsatz unspezifischer Reaktionen bei Hesses Fällen vorgekommen sein müsse und hebt hervor, daß Eigenhemmung bei Lues seltener vorkomme als positive Reaktion. Bei der Eigentümlichkeit unserer Methode, die von der gerade noch lösenden Alexinmenge mit Berücksichtigung der Extrakt- und Serumhemmung ausgeht, war reichliche Gelegenheit gegeben, die Frage der Eigenhemmung und deren Bedeutung besonders zu studieren. Die Art unserer Serumkontrolle ermöglicht auch Feststellungen über die Höhe der Eigenhemmung bei einzelnen Seren. Diese Untersuchungen beschränkten sich nicht nur auf inaktivierte, sondern betrafen auch mehrere hundert nicht erhitzte, also aktive Seren. Was nun die Angaben von Hecht und Müller anlangt, daß jedes Serum auch ohne Antigen eine gewisse Summe Komplement binde, so haben wir den gleichen Befund erhalten. Nur selten ist der Alexintiter ohne Normalserum gleich hoch wie der mit Serumzusatz. Ein gewisser Grad von Hemmung ist daher fast jedem Serum eigentümlich. Diese, den einzelnen Seren zukommende Hemmungswirkung ist nun dem Grade nach recht verschieden. Ob man eine größere oder kleinere zum Ausgleich dieser Schutzwirkung erforderliche Alexinmenge findet, hängt lediglich von dem Überschuß an Alexin als Serum ab, den man bei der Bestimmung dieser Schutzwirkung oder Eigenhemmung wählt. Unsere Versuchsreihen gliedern sich nach dieser Richtung in 3 Gruppen: Bei den Untersuchungen in Teschen arbeiteten wir überwiegend mit unspezifischen Extrakten, von denen wir die halbe unterbindende Dosis verwendeten; die Extrakteigenhemmung spielte kaum eine Rolle. In dieser Zeit wurde die Eigenhemmung bei 1135 inaktivierten Seren bestimmt und hiebei gefunden, daß von den sicher nicht luetischen Seren rund 32 Proz. eine Eigenhemmung nachweisen ließen, von den sicher positiven hingegen 50,7 Proz. Wir konnten also die Erfahrungen anderer Autoren, wonach positive Sera häufiger Eigenhemmungen zeigen, bestätigen. Eine noch weitergehende Bestätigung ergaben die Untersuchungen in München. Unter 1810 inaktivierten positiven und negativen Seren fanden sich 623 d. s. 34 Proz. mit Eigenhemmung; von den 1348 negativen Seren zeigten 294 d. s.

22 Proz. Eigenhemmung, hingegen von den 462 positiven 329 d. s. 71 Proz. Nach den Münchener Untersuchungen ist daher der Unterschied zwischen positiven und negativen Seren hinsichtlich des Vorkommens der Eigenhemmung wesentlich größer, aber immerhin ist die Eigenhemmung bei positiven Seren nicht so konstant, daß man daraus allein die Diagnose ableiten könnte, wie dies Hesse vorschlug. Wie groß ist nun der Grad dieser Eigenhemmung? Nach dieser Richtung können wir der Angabe von Hecht nicht völlig beistimmen. Wir haben bei positiven und negativen Seren in der Regel nur etwa ¼ einer Alexineinheit als Mehrverbrauch an Alexin infolge von Eigenhemmung finden können, aber es gibt auch Sera, bei denen eine Eigenhemmung bis zu 1 Alexineinheit und darüber festzustellen war. Bei den 1810 Untersuchungen in München wurden immerhin 14 Sera dieser Art gefunden. Der Überblick über diese verschiedenen Grade von Eigenhemmung der Menschenseren läßt es begründet erscheinen, daß wir eine besondere Serumkontrolle einschalteten.

Die vorher erwähnten Hinweise einiger Autoren auf die Bedeutung des Vorkommens von Normalpräparinen wollen wir auch unserseits in Übereinstimmung mit Müller als unberechtigt bezeichnen. Wiederholte Untersuchungen auf den Gehalt von Normalpräparinen sowohl in Teschen wie in München haben stets ergeben, daß dieser Gehalt im Menschenserum im Vergleich mit dem großen Überschuß an hämolytischem Immunserum ein verschwindender ist und daher vernachlässigt werden kann. Gewöhnlich bewirkten die Normalpräparine nur etwa eine Verminderung des Alexintiters um $^1/_{10}$ einer Alexineinheit. Es ist daher nur möglich, daß bei Seren, in denen keine Eigenhemmung nachgewiesen werden kann, die doch vorhandenen Spuren durch die Wirkung der Normalpräparinen gerade noch verdeckt werden. Auf die Feststellung von Eigenhemmungen überhaupt können derartige Spuren von Normalpräparinen keinen Einfluß haben.

Eine Frage verdient noch Erwähnung: Inwiefern das Vorkommen von Eigenhemmung bei inaktiven Seren durch das Alter der einzelnen Seren, d. h. durch die Zahl der Tage nach der Blutentnahme beeinflußt ist.

Die Bestimmungen der Eigenhemmung inaktivierter Sera wurden verschieden lange Zeit nach der Blutentnahme vorgenommen. Es fand sich Eigenhemmung ebenso bei Seren, die fast unmittelbar nach der Blutentnahme inaktiviert und gleich hernach untersucht wurden, wie bei Seren, die erst 4 bis 5 Tage nach der Inaktivierung in Verarbeitung genommen werden konnten. Im allgemeinen nimmt die Eigenhemmung der inaktivierten Seren mit der Dauer der Aufbewahrung zu, doch kommt es hiebei nach unseren Erfahrungen auf die Möglichkeit der Zersetzung an. Wird steril entnommenes Blut schnell zentrifugiert, das Serum inaktiviert und in einem sterilen Gefäße wohl verschlossen im kühlen Schranke aufbewahrt, so lassen sich Wochen hindurch keine Veränderungen im Serum nachweisen; die Eigenhemmung nimmt höchstens um eine Spur zu. Bei weniger sorgfältigen Arbeiten bleibt der Grad der Eigenhemmung mindestens durch einige Tage konstant, um dann allerdings rasch eine Zunahme aufzuweisen. Anderseits ist es nach vielen Autoren feststehend, daß die Eigenhemmung schnell zunimmt, wenn das Serum nicht bald vom Blutkuchen getrennt wird. Auf diese Erscheinung ist die Tatsache zurückzuführen, daß Leichensera zumeist einen sehr hohen Grad von Eigenhemmung zeigen.

Bei einem gegebenen Serum hängt die Größe der eintretenden Hemmung von der verwendeten Serummenge ab. Werden statt 0,1 Serum 0,4 ccm genommen, wie dies nach der Methodik von Kromayer und Trinchese verlangt wird, so ist auch die Eigenhemmung im Vergleich zur normalen Serummenge wesentlich erhöht, wenn auch nicht gerade vervierfacht. In dieser Erscheinung liegt ein besonderer Nachteil dieser Methode. Anderseits läßt sich nachweisen, daß bei Verwendung von starken Serumverdünnungen z. B. bei Verwendung von 0,01 Serum, die Eigenhemmung nur mehr in Spuren oder gar nicht zu finden ist.

Die Ursache der häufigen Eigenhemmung durch Patientenserum ist auch heute noch nicht völlig aufgeklärt. Man kann nur mit Müller im allgemeinen annehmen, daß bei manchen Erkrankungen, wie speziell bei Lues, gewisse Komplement adsorbierende Substanzen (Kolloide) im Serum auftreten können.

Viel Berechtigung scheint die Annahme von Aoki und Landsteiner zu haben, daß das Auftreten der Eigenhemmung im Serum mit der Bildung von Antikörpern parallel gehe. Diese Vermutung fanden wir in ausgedehnter Weise bestätigt bei umfangreichen Untersuchungen an schutzgeimpften Militärpersonen. Fortlaufende Untersuchungen Wochen und Monate nach der Cholera- und Typhusschutzimpfung ließen in den Seren deutlich Eigenhemmung nachweisen, während die Sera derselben Personen vor und unmittelbar nach der Impfung noch keine Eigenhemmung hatten erkennen lassen. Bekanntlich wird für viele Infektionskrankheiten behauptet (Scharlach, Tuberkulose, Pneumonie, Malaria, Lepra usw.), daß sich in den Seren der befallenen Personen ziemlich häufig eine sicher positive Wassermannsche Reaktion nachweisen lasse. Es wird eine besondere Aufgabe bilden, die Angaben in der Literatur nach unserer Methodik nachzuprüfen und genau festzustellen, wie häufig Eigenhemmung mit spezifischer Komplementbindung verwechselt worden ist.

Von theoretischer Wichtigkeit ist in diesem Zusammenhange noch die Frage, ob die Feststellung der komplementbindenden Substanzen in den Patientenseren bei verschiedenen Volumen der Versuchsflüssigkeit sich ebenso verhält wie die der hämolytischen Ambozeptoren. Unsere Methodik ließ Versuche nach dieser Richtung leicht zur Ausführung bringen. Es wurden wiederholt Untersuchungen angestellt an verschiedenen Seren in Flüssigkeitsmengen von 2,5, 5 und 7 ccm. Stets wurde das Ergebnis gefunden, das unabhängig von den Flüssigkeitsvolumen die Zahl der durch das sog. Antigen — Antikörpergemisch — gebundenen Komplementeinheiten die gleiche blieb. Es war nur wieder ein längeres Verweilen im Brutschrank notwendig, um bei allen Voluminis das gleiche Resultat zu erhalten. Aus diesen Feststellungen ergibt sich somit die Tatsache, daß wie bei den hämolytischen Immunseren auch im luetischen Serum die Wirkung der Antikörper (Luesreagine) von der Konzentration völlig unabhängig ist.

Wesentlich andere Beurteilung muß die Angabe von Müller über das Vorkommen von Eigenhemmungen bei aktiven Seren finden. Bei derartigen Seren sind die Verhältnisse viel kompli-

zierter, da außer den Normalpräparinen das Eigenkomplement noch vorhanden ist. Es machen sich da drei Einflüsse geltend: das Eigenkomplement, die Normalpräparine und die Eigenhemmung.

Zusammenfassung für den Abschnitt II.

Gründe für die Abänderung der Methode zur Wassermannschen Reaktion:

1. Reziprokes Verhältnis zwischen den zur kompletten Hämolyse erforderlichen Mengen von Präparin und Alexin.
2. Starkes Schwanken der lytischen Wirkung des aktiven Meerschweinchenserums.
3. Eigenhemmung des Patientenserums in wechselnder Stärke.
4. Eiweißfällende und hämolytische, teilweise hemmende Wirkung der Organextrakte in wechselnder Stärke.
5. Wirkung der Patientensera auf die Extrakte.

Unterscheidende Merkmale der abgeänderten Methodik gegenüber der Originalmethode und anderen Abänderungsvorschlägen:

1. Genaue Bestimmung der Komplement-(Alexin-)Einheit (KE oder AE) als Grundlage.
2. Berücksichtigung der Extrakt- und Serumwirkung bei Feststellung der Komplementeinheit.
3. Vermeidung eines Alexinüberschusses beim Grundversuch.
4. Konstante Extrakt- und Serummengen bei steigenden Alexineinheiten zur quantitativen Bestimmung der spezifischen Alexinbindung.
5. Einschaltung einer besonderen Serumkontrolle mit ähnlich ansteigenden Alexineinheiten.
6. Art der Extraktkontrolle.
7. Ersatz der Extraktkontrolle durch eine Extrakt-Serumkontrolle beim einzelnen Versuch.
8. Beurteilung des quantitativen Ergebnisses unter Berücksichtigung der Serumeigenhemmung.

Vorzüge dieser abgeänderten Methodik:

1. Erhöhte Empfindlichkeit der Reaktion.

2. Vermeidung von Störungen durch unspezifische Hemmungen.

3. Quantitative Wertung des Grades der spezifischen Einwirkung.

4. Erleichterung der Durchführung durch Beschränkung auf einen spezifischen Extrakt und Wegfall der Vergleichssera.

Theoretisch-praktisches Ergebnis nach dieser Methode:

1. Bestätigung der größeren Häufigkeit von stärkerer Eigenhemmung der Luessera im Vergleiche mit Normalseren.

2. Unabhängigkeit der Komplementbindung (Adsorption) durch das Extrakt-Antiserumgemisch von dem Flüssigkeitsvolumen.

3. Bestätigung der Überlegenheit spezifischer Extrakte gegenüber unspezifischen Organextrakten für die Wassermannsche Reaktion.

III. Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Methoden[1]).

An vergleichenden Untersuchungen mit den verschiedensten für die Wassermannsche Reaktion in Vorschlag gebrachten Methoden hat es bisher nicht gefehlt. Derartige Parallelversuche wurden jedoch zumeist in der Weise angestellt, daß man die Zahl der positiven Befunde für die verschiedenen Methoden verglich, und derjenigen Methode den Vorzug gab, die mehr positive Resultate zeigte. Die Gründe, weshalb in dem einen oder dem an-

---

1) Die Durchführung dieses Teiles der Untersuchungen wurde lediglich durch das große Entgegenkommen und die weitgehende Unterstützung folgender Persönlichkeiten ermöglicht: für Teschen Herr Obersanitätsrat Direktor Hinterstoißer, Dr. Wittmann, Primarius Dr. Sederl in Mährisch-Ostrau, Oberarzt Dr. Fasal, damals in Leipnik, für München Herr Professor v. Zumbusch als Vorstand der dermatologischen Universitätsklinik und Sekundararzt Dr. Blank, Herr Ministerialrat Prof. Dieudonné als derzeitiger Leiter der Kgl. Militärärztlichen Akademie und Veterinärarzt Dr. Frikinger, Herr Direktor Prof. Rimpau und Herr Dr. Keck von der Kgl. Bakteriologischen Untersuchungsanstalt. Auch an dieser Stelle sei allen Herren herzlichst gedankt.

deren Falle ein positives oder negatives Resultat sich ergab, konnten nicht klar genug hervorgehoben werden, da die volle Einsicht in die Beziehungen der einzelnen Agentien fehlte. Oft wurde nur einfach die Hälfte der nach der Originalmethode verlangten Komplementmenge von 0,5 ccm Meerschweinchenserum in der Verdünnung 1 : 10 genommen und nun festgestellt, ob die Anzahl der positiven Resultate größer wurde und ob nicht zugleich unspezifische Hemmungen bemerkt werden konnten. Falls sich dies herausstellte, wurde oft die Dosis an Immunserum erhöht oder die Serummenge herabgesetzt und ähnliche Veränderungen vorgenommen, die alle der unzulänglichen Einsicht in die genaueren Beziehungen entsprangen. Es kann nicht wundernehmen, daß diese Verschiedenheiten in der Methodik und deren Unsicherheit auch den Praktikern nicht verborgen blieben.

Großes Aufsehen erregte seinerzeit eine Aussprache in der Berliner Medizinischen Gesellschaft im Jahre 1910, die durch einen Vortrag von Freudenberg[1]) über entgegengesetzte Resultate bei verschiedenartiger Ausführung der Wassermannschen Reaktion hervorgerufen war. Auch in der letzten Zeit hat es an Mahnungen zur Vorsicht bei der diagnostischen Verwertung der Wassermannschen Reaktion nicht gefehlt. Heller[2]) ließ in den letzten Jahren wiederholt dieselben Sera in verschiedenen Instituten Berlins untersuchen und hob hervor, daß Unstimmigkeiten in der serologischen Diagnose gerade bei jenen Fällen am häufigsten vorkommen, in denen die Sicherung der Diagnose am meisten erwünscht war. Er geht so weit, von einer Launenhaftigkeit der Untersuchungsmethoden zu sprechen und glaubt, daß die Widersprüche nicht zu Lasten des einzelnen Untersuchers, sondern zu Lasten der Methodik zu schreiben seien. Auch Freudenberg hat in Nr. 42 derselben Zeitschrift abermals über Ergebnisse von vierfachen, dreifachen und doppelten Untersuchungen derselben Sera berichtet und die sarkastische Bemerkung daran geknüpft, daß der Praktiker hinsichtlich des Ausfalls einer Wassermannschen Reaktion völlig von dem Untersucher abhängig sei.

---

1) Berl. kl. W. 1910, Nr. 26.
2) Berl. kl. W. 1916, Nr. 35.

Auch Saalfeld[1]) führt Beispiele von Serumuntersuchungen mit verschiedenen Resultaten an und kommt zur Überzeugung, daß nur eine einheitliche Regelung der praktischen Handhabung der Serumdiagnostik der Syphilis diesem unhaltbaren Zustand einer so bedeutungsvollen Untersuchungsmethode ein Ende bereiten könne. Auf diese Angriffe in der letzten Zeit, die doch mehr oder weniger die Zuverlässigkeit der Wassermannschen Reaktion in Frage stellten, fühlte sich A. von Wassermann selbst zu einer Entgegnung und Widerlegung veranlaßt. Wassermann wandte sich scharf gegen den Versuch, den Eindruck zu erwecken, als ob die von ihm mit Bruck und Neisser angegebene Reaktion in der Hand verschiedener Untersucher verschiedene Resultate ergeben müsse. Wenn das — so sagt Wassermann — unabänderlich der Fall wäre, dann würde die Reaktion tatsächlich unbrauchbar sein. Den Gegenbeweis suchte Wassermann derart zu erbringen, daß er im Herbst 1916 50 Sera in seinem Institute und in der Kaiser-Wilhelms-Akademie gleichzeitig untersuchte, bzw. deren Untersuchung veranlaßte und von einem Unparteiischen die Befunde vergleichen ließ. Das Resultat war folgendes: von diesen 50 Seren zeigten 48 völlige Übereinstimmung nach der gewöhnlichen Einteilung der Resultate in positive, zweifelhafte und negative, und nur bei 2 Fällen war das Resultat an der einen Stelle negativ, bzw. zweifelhaft, an der anderen Stelle zweifelhaft, bzw. positiv. Die Übereinstimmung ist tatsächlich eine so weitgehende, wie sie bei einer derartigen schwierigen Untersuchung nur verlangt werden kann. Wassermann zieht aus diesem Ergebnis folgende Schlüsse: Mit dieser Belastungsprobe ist von neuem bewiesen, daß die Wassermannsche Reaktion technisch vollkommen übereinstimmende Resultate in verschiedenen Händen zu liefern imstande ist. Wassermann scheint also noch immer zu glauben, daß lediglich bei Einhaltung der Vorschriften der Originalmethode seitens verläßlicher Untersucher in ähnlicher Weise übereinstimmende Resultate sich ergeben müssen. In den Schlußsätzen seiner Entgegnung äußert sich Wassermann aber vorsichtiger mit den Worten: Mit der heutigen Arbeit (d. h. mit

1) D. med. W. Nr. 44, 1916.

den heute übereinstimmenden Ergebnissen) sei also nur der technische Beweis geliefert, daß die Wassermannsche Reaktion eine beinahe absolute Sicherheit für unter sich übereinstimmende Resultate bietet, sofern sie von den verschiedenen Untersuchern auch völlig übereinstimmend ausgeführt wird. In diesem Satz legt Wassermann besonderes Gewicht auf völlige Übereinstimmung der Reagentien. Diese Auffassung geht weit über den Rahmen einer nur korrekten Ausführung eines Versuchs nach der Originalvorschrift hinaus. Die Forderung der Übereinstimmung der Agentien müßte umfassen die Benützung der gleichen Immunsera, der gleichen Extrakte und der gleichen Komplementsera an einem Versuchstage, während bei Übereinstimmung der Methodik allein alle drei Agentien zwar korrekt gewonnen, aber der Abkunft nach verschieden sein könnten. Ob die Wassermannsche Beweisführung geglückt ist oder nicht, hängt von der Beantwortung dieser Annahmen ab. Befassen wir uns zunächst bei Besprechung vergleichender Untersuchungen mit der Originalmethode, aber unter der Voraussetzung, daß die Untersuchungen genau nach der Originalvorschrift vorgenommen werden, und vergleichen wir diese Ergebnisse mit den nach unserer Methodik erreichten Resultaten.

A. Methoden mit inaktiviertem Patientenserum.

1. Die Original-Wassermann-Methode.

Wie bereits hervorgehoben, liegt unseres Erachtens die größte Schwäche der Originalmethode in der Nichtbeachtung des Komplementtiters. Von der Genauigkeit dieses Titers hängt die Sicherheit des Nachweises der Komplementbindung und namentlich des Nachweises des ersten Auftretens einer spezifischen Bindung ab. Boas macht bereits in seiner Schrift darauf aufmerksam, daß das Ergebnis der Wassermannschen Reaktion von den Schwankungen des Komplementwertes in hohem Grade abhängen müsse. Obwohl Boas annahm, daß der mittlere Komplementtiter 0,05 ccm beträgt und diese Dosis bei der nun allgemein eingeführten Flüssigkeitsmenge von 2,5 ccm, der von Wassermann stets verwendeten Dosis entspricht, nimmt er doch für

jede Versuchsreihe eine besondere Komplementtitrierung vor, um die kleinste totallösende Komplementdosis völlig sicher als Ausgangspunkt zu gewinnen.

Besonders eingehend und treffend schilderte Sormani[1]) die Gefahren der Nichtbeachtung des Komplementtiters für die Originalmethode. Er rechnet nach, daß bei Verwendung von gleichmäßig 0,1 ccm unverdünntem Komplement bei der Gesamtmenge von 5 ccm z. B. nur 0,04 ccm zum Auflösen der Hbl. notwendig waren, der Rest von 0,06 ccm vielleicht nur zum kleineren Teile für die Extrakt- oder Serumeigenhemmung erforderlich ist, so daß für die Auswertung des Bindungsvermögens der Sera noch 0,02 oder 0,04 ccm Komplement übrig bleiben, die als reichlicher Überschuß keine Hemmung erkennen lassen. In einem anderen Falle kann wieder durch das hämolytische System und durch die Extrakt- und Serumeigenhemmung mehr als 0,1 ccm Komplementserum verbraucht werden, so daß auch ohne spezifische Bindung die Hemmung in die Erscheinung tritt. So konnte Sormani bei 800 vergleichenden Untersuchungen feststellen, daß ungefähr 15 Proz. der Sera, die nach der Original-Wassermann-Methode negativ reagierten, bei seiner besonderen Methode positive Reaktion zeigten. Immerhin haben die Untersuchungen von Sormani den Nachteil, daß sie die Unterschiede in den Befunden lediglich feststellen, aber nicht quantitativ messen konnten. Gerade für eine derartige quantitative Kontrolle ist unsere Methode besonders geeignet. Der Komplementtiter wird an jedem einzelnen Versuchstag und namentlich auch während des Hauptversuches bestimmt; der Verbrauch an Komplement durch das Extrakt-Serumgemisch in Komplementeinheiten ausgedrückt, so daß sich die Unterschiede genau erkennen lassen. In der nun folgenden Tabelle sind aus der Gesamtheit von 538 vergleichenden Untersuchungen in Teschen einstweilen diejenigen herausgegriffen, die bei den verschiedenen Komplementtitern, die sich im Laufe des Jahres ergaben, als Grenzfälle betrachten lassen.

Wie aus dem Kopf der Tabelle ersichtlich, ist der jeweilige Komplementtiter in genauer Auswertung nach unserer Methode

1) Z. f. I. f. Orig.-Bd. 11, 1911.

Nr.	Unsere Methode		Gesamtmenge	Original-Wa.R		Nr.	Unsere Methode		Gesamtmenge	Original-Wa.R	
	Verbrauch an KE	Komplementtiter	ccm	Komplementmenge	Ergebnis		Verbrauch an KE	Komplementtiter	ccm	Komplementmenge	Ergebnis
58	$^2/_3$ KE	0,015	5	0,1	neg.	87	1 KE	0,05	2,5	0,05	sH
42	$^1/_2$ KE	0,015	5	0,1	neg.	50	$1^1/_2$ KE	0,04	2,5	0,05	dH
36	2 KE	0,015	5	0,1	neg.	573	1 KE	0,015	2,5	0,05	L
38	$^1/_2$ KE	0,02	5	0,1	neg.	578	5 KE	0,015	2,5	0,05	cH
21	$1^1/_2$ KE	0,02	5	0,1	neg.	135	2 KE	0,015	2,5	0,05	L
463	3 KE	0,01	2,5	0,05	neg.	188	3 KE	0,015	2,5	0,05	L
246	3 KE	0,01	2,5	0,05	neg.	186	7 KE	0,015	2,5	0,05	cH
299	2 KE	0,01	2,5	0,05	neg.	22	2 KE	0,02	2,5	0,05	L
573	1 KE	0,01	2,5	0,05	neg.	61	3 KE	0,02	2,5	0,05	cH
667	5 KE	0,01	2,5	0,05	neg.	185	1 KE	0,02	2,5	0,05	L
87	1 KE	0,01	2,5	0,05	neg.	49	$1^1/_2$ KE	0,025	2,5	0,05	L
50	$1^1/_2$ KE	0,01	2,5	0,05	neg.	522	2 KE	0,025	2,5	0,05	sH
162	3 KE	0,01	2,5	0,05	neg.	589	$2^1/_2$ KE	0,025	2,5	0,05	cH
163	2 KE	0,01	2,5	0,05	neg.	332	$1^1/_2$ KE	0,03	2,5	0,05	sH
162	3 KE	0,02	2,5	0,05	pos.	420	1 KE	0,03	2,5	0,05	L
163	2 KE	0,03	2,5	0,05	pos.	604	2 KE	0,03	2,5	0,05	cH

in Kolonne 3 und die jeweilige verwendete Komplementmenge nach der Original-Wassermann-Methode in Kolonne 5 angegeben. Die ersten 5 Sera wurden in einer Gesamtmenge von 5 ccm ausgewertet. Bei dieser Menge wurde nach der Original-Wassermann-Methode stets 0,1 Komplementserum genommen und auch bei unserer Methode ist der Komplementtiter bei diesem Volumen etwas erhöht. Es zeigt sich, daß bei einem sicheren Verbrauch von ½ bis 2 KE. nach unserer Methode bei der Original-Wassermann-Methode selbst bei einem Komplementtiter von 0,02 glatte Lösung eintrat. Das Ergebnis ist völlig klar, da in Anbetracht des großen Komplementüberschusses von 0,1 ccm bei der Originalmethode erst bei einem Komplementverbrauch von 5 KE. eine Hemmung hätte auftreten können. Im weiteren Verlauf der linksseitigen Kolonnenreihe, wie auch in der rechten Reihe sind nur Vergleiche bei einem Gesamtvolumen von 2,5 ccm gebracht, und zwar zunächst Unterschiede bei einem Komplementtiter von 0,01 bei unserer Methode und einem regelmäßigen Komplementüberschuß von 0,05 ccm bei der Originalmethode. Selbst bei einem Verbrauch von 3, ja sogar von 5 KE. ergibt sich bei

der Originalmethode noch völlige Lösung. Nur bei Nr. 667 war nach der Originalmethode bei einem Verbrauch von 5 KE. nach einer halben Stunde noch deutliche Hemmung zu erkennen, die nach einer weiteren Stunde in Lösung überging, also auch hier ein negatives Resultat ergab. Im letzten Teile der linksseitigen Kolonnenreihe sind eine Anzahl Sera nochmals gebracht und hier angegeben, wie künstlich durch Verdünnung des Komplementserums, also durch Erniedrigung des Komplementtiters ein positiver Wassermann hervorgebracht werden kann. Während z. B. Nr. 162 bei einem Komplementtiter von 0,01 und einem Komplementverbrauch von 3 KE. noch negativen Original-Wassermann gibt, wird die Reaktion positiv bei einem Komplementtiter von 0,02. In ähnlicher Weise konnte auch bei Nr. 163, 87 und 50 ein positiver Wassermann und zwar bei den beiden letzten Nummern durch besondere Abstufungen gerade die Grenze der Reaktion mit *sH* bzw. *dH* erreicht werden. In der rechtseitigen Kolonnenreihe sind Beispiele mit verschiedenen Komplementtitern von 0,015 bis 0,03 gebracht. Wir finden hier z. B. in Nr. 578, daß bei einem Verbrauch von 5 KE. bei einem Komplementtiter von 0,015 jetzt *cH* sich zeigt oder in Nr. 61 bei einem Verbrauch von 3 KE. und einem Komplementtiter von 0,02. In den Nr. 522 und 322 ist wieder mit 2 KE. und 0,025 Komplementtiter bzw. 1½ KE. und 0,03 Komplementtiter die Grenze der Reaktion mit *sH* erreicht. Mit diesen Angaben soll nur eine kleine Blütenlese geboten werden. Es ist anzunehmen, daß schon aus den wenigen Gegenüberstellungen alle Möglichkeiten von Unterschieden im Ausfall der Reaktion nach unserer Methode und nach der Original-Wassermann-Methode zu erkennen sind.

Das gesamte Ergebnis geht dahin, daß von den 538 Untersuchungsseren 341 d. s. 63 Proz. nach unserer Methode eine sichere positive Reaktion zeigten. Es sei besonders betont, daß Spuren einer Hemmung selbst bis zu einem Verbrauch von ⅓ einer KE. bei gleichzeitiger glatter Lösung der Extrakt- und Systemkontrolle und nach Abzug des Komplementverbrauchs durch Eigenhemmung der Sera in dieser Zusammenstellung nicht aufgenommen wurden. Es liegen daher sicher positive Befunde vor — Be-

funde, die mindestens einen Komplementverbrauch von einer halben Einheit zeigten, entsprechend einer deutlichen Hemmung mit *dH* oder *fcH*, also auch mindestens einer kleinen Kuppe (Bodensatz von roten Blutkörperchen). Nach der Original-Wassermann-Methode hingegen wurden nur 194 positive Befunde festgestellt, d. s. 36 Proz. gegenüber 63 Proz. bei unserer Methode. Allerdings ist hiebei besonders hervorzuheben, was bereits betont wurde, daß der Komplementtiter bei unseren Untersuchungen zumeist nur 0,01 betrug. Bei einem derartig großen Unterschiede zwischen den Komplementmengen bei unserer Methode und dem ständigen Komplementüberschuß von 0,05 bei der Original-Wassermann-Methode müssen natürlich die Unterschiede besonders groß ausfallen. Bei einem Komplementtiter von 0,2 oder gar 0,3 würden die Unterschiede entsprechend kleiner werden. Dieser Einfluß des jeweiligen Komplementtiters auf die Größe der Unterschiede beim Vergleich beider Methoden sind bereit aus der früheren Tabelle zu erkennen gewesen. Allerdings wird die Eigenhemmung des Extraktes bei der Originalmethode nicht richtig bewertet. Bei einem Komplementüberschuß, dessen Umfang unbekannt ist, läßt sich der Einfluß der Eigenhemmung des Extraktes wie des Serums nicht erkennen. Hiedurch entstehen neue Fehlerquellen.

Eine besondere Zusammenstellung jener Fälle positiver Original-Wassermann-Reaktion, die eine komplette Hemmung zeigten, ergab, daß dies 177 von den 194 positiven Fällen waren; nur 17 hingegen zeigten sich mit dem Befunde von *sH* und *dH* als Grenzfälle. Mit dieser Gegenüberstellung soll betont werden, wie wenig Bedeutung bei der Original-Wassermann-Methode die Kreuzbezeichnung hat. Man kann kurz sagen, der Befund ist entweder komplette Hemmung oder Lösung. Grenzfälle sind bei Verwendung eines derartig großen Komplementüberschusses sehr selten. Eine weitere Zusammenstellung derjenigen positiven Befunde nach unserer Methode, die einen Komplementverbrauch bis zu 2 KE. hatten, ergab nicht weniger als 127 von den 341 positiven Fällen, also rund 37 Proz. Von diesen Fällen kann man sagen, daß sie selbst bei einem Kom-

plementtiter bis von 0,025 — ein Titer, wie er sich nach unseren Untersuchungen nur selten ergibt — nach der Original-Wassermann-Methode unter der Annahme, daß die Extrakteigenhemmung keine Bedeutung hat, stets einen negativen Befund ergeben müssen. Ohne auf die Gliederung nach den einzelnen Luesstadien hier näher einzugehen, wäre darauf aufmerksam zu machen, daß diese Fälle mit geringem Komplementverbrauch gerade jene Fälle sind, die, wie Heller besonders hervorhob, am meisten eine Sicherung der Diagnose erwünscht erscheinen lassen. Gerade diese Fälle, zumeist ohne klinische Symptome oder im Initialstadium ergeben nach der Original-Wassermannschen Reaktion einen negativen Befund.

Doch abgesehen davon, daß viele positive Fälle mit der Originalmethode nicht erkannt werden, sind nunmehr auch die Schwankungen der Resultate bei wiederholten Untersuchungen verständlich. Sera z. B., die nach unserer Methode einen Komplementverbrauch von 1 KE. aufweisen, werden allerdings nach der Originalmethode auch bei kleineren Schwankungen des Komplementtiters von Tag zu Tag, falls der Luesreagingehalt nicht plötzlich stark ansteigt, nicht positiv werden. Sera jedoch, die nach dem Komplementtiter und dem Gehalt an Luesreaginen an einem Tage knapp am Manifestwerden der Reaktion sind, können trotz gleichbleibendem oder sogar etwas abnehmendem Reagingehalt das nächste Mal, sobald der Komplementtiter 0,2 oder ausnahmsweise 0,25 wird, plötzlich positiv werden und umgekehrt. Die gleichen Unstimmigkeiten sind bei Untersuchungen desselben Serums in verschiedenen Instituten am selben Tage möglich, falls alle nach der Originalmethode arbeiten. Je nach dem Komplementtiter der einzelnen Meerschweinchensera in den verschiedenen Instituten und je nachdem, ob Extraktmengen mit oder ohne Eigenhemmung Verwendung finden, müssen die Resultate bei bestimmten Patientenseren, die als Grenzfälle anzusprechen sind, verschieden sein.

Diese Art von vergleichenden Untersuchungen, nach unserer Methodik und nach der Original-Wassermannschen Methode an verschiedenen Stellen, wurde auch in München fortgesetzt. Zunächst wurden 1292 Untersuchungen mit Seren aus der der-

matologischen Universitätsklinik (Vorstand Professor Zumbusch) ausgeführt. An der Klinik wurde nach der Originalmethode zumeist mit 2 spezifischen Extrakten gearbeitet. Hier wurden nach unserer Methodik 363 positive Befunde ermittelt, d. s. 28,1 Proz., nach der Originalmethode 245 positive Befunde, d. s. 19,0 Proz. Die positiven Befunde waren im Münchener Material, wie man sieht, im allgemeinen spärlicher als im Material aus dem Etappenraum in Teschen, das allerdings durchweg aus einer Sonderanstalt für Geschlechtskranke stammte. Die Differenz jedoch zwischen den positiven Befunden nach der einen und nach der andern Methode ist trotz der Verwendung spezifischer Extrakte annähernd die gleiche. Eine weitere Übereinstimmung zeigte sich auch bei den Münchener Untersuchungen hinsichtlich der zweifelhaften Ergebnisse. Von den 1292 Seren wurde nach unserer Methode bei 131, d. s. 10 Proz., zweifelhafte Befunde ermittelt, von denen allerdings 60, d. i. fast die Hälfte, nur wegen stärkerer Eigenhemmung diese Bezeichnung erhielten. 71 Sera wurden jedoch als zweifelhaft angegeben, weil sie im Sinne der Vorschrift von Wassermann wohl Hemmung zeigten, jedoch nicht die höchsten Grade der Hemmung. Nach der Originalmethode wurden nur 32 zweifelhafte Befunde, d. s. kaum 2,5 Proz. ermittelt; es ist begreiflich, daß nach der Originalmethode zweifelhafte Resultate stets in kleinerer Zahl gefunden werden. Die nach unserer Methode als zweifelhaft bezeichneten Fälle, die eine schwach positive Reaktion erkennen ließen, sind nach der Originalmethode überhaupt glatt durchgeschlüpft; aber es sind dies gerade Fälle, die Verdacht erregen und einer 2. Untersuchung zugeführt werden müssen.

Noch strenger nach der Originalmethode wird an einer weiteren Vergleichsstelle gearbeitet, an der Militärärztlichen Akademie in München. Wie bereits hervorgehoben, beziehen diese Anstalten die Extrakte wie auch die Immunsera aus der Kaiser-Wilhelms-Akademie. Die wesentlichen Agentien sind daher kontrolliert, nur die Aktivsera müssen an Ort und Stelle gewonnen werden. Um die Unterschiede für die beiden Methoden noch schärfer hervortreten zu lassen, so haben wir auch mit denselben vom Wassermannschen Institut geprüften Extrakten gearbeitet. Das

Ergebnis war folgendes: Von 524 Seren wurden nach unserer Methode 106, d. s. 20,2 Proz. positive gefunden, nach der Originalmethode nur 75, d. s. 14,3 Proz. Gegenüber den Ergebnissen mit den Seren der Klinik Zumbusch sind nicht unbeträchtliche Unterschiede vorhanden. Vielleicht sind diese Unterschiede in Verschiedenheiten der Agentien, insbesondere des Meerschweinchenserums gelegen. An beiden Stellen werden die Aktivsera immer frisch genommen; gelegentliche Auswertungen der Aktivsera an der Universitätsklinik haben jedoch zumeist einen Normaltiter von 0,01 oder 0,015 ergeben, während nach den Feststellungen an der Akademie dortselbst nicht selten ein Alexintiter von 0,03, sogar von 0,04 gefunden wird. Es ist erklärlich und nach den früheren Ausführungen sofort einzusehen, daß die Unterschiede in den Befunden nur durch die Verwendung etwas weniger wirksamer Aktivsera an der Akademie verständlich sind. Es gab bei den vergleichenden Untersuchungen mit der Akademie Tage, an denen dortselbst sogar mehr positive Seren gefunden wurden wie nach unserer Methode. Diesen positiven Befunden war ein klinischer Untergrund nicht gegeben. Die Befunde waren daher auf unspezifische Hemmungen zurückzuführen. An diesen Tagen dürfte das Aktivserum besonders unwirksam gewesen sein.

Mit der Angabe dieser Unterschiede nach der Original-Wassermannschen Methode und nach unserer quantitativen Methode sind lediglich Befundstatsachen gebracht. Die naheliegende Frage, ob dieses Plus an positiven Befunden auf unserer Seite auch klinisch Lues war, oder ob andere konsumptive Krankheiten, die hie und da positive Reaktion zeigen, darunter enthalten waren, und schließlich die Frage des Vorkommens unspezifischer Hemmungen, wollen wir später im Zusammenhang erörtern. Es wäre nun leicht, die quantitativen Unterschiede in der Komplementbindung für alle nur nach unserer Methode positiven Fälle ähnlich zu gliedern, wie wir dies an dem Material aus Teschen getan haben. Wir wollen jedoch hievon absehen, da die Verhältnisse nach dieser Richtung bereits völlig geklärt sind.

Die Ansicht Wassermanns jedoch, daß unter gleichen Bedingungen auch nach der Originalmethode übereinstimmende

Resultate erhalten werden, hat uns zu vergleichenden Versuchen veranlaßt. In einer großen Zahl von Fällen wurde gleichzeitig mit den betreffenden Untersuchungsstellen (Universitätsklinik und Militärärztliche Akademie) auch im Hygienischen Institut außer nach der eigenen Methode auch nach der Originalmethode die Untersuchung vorgenommen. Mit dem Material der Universitätsklinik wurden 1065 Sera beiderseits nach der Originalmethode untersucht und hiebei in unserem Institute 180, d. i. 16,9 Proz. positiv gefunden, an der Klinik jedoch 208, also rund 20 Proz. Mit dem Material der Militärärztlichen Akademie fanden 411 derartige Vergleichsuntersuchungen statt, bei denen im Hygienischen Institute 34, d. i. 8,2 Proz., in der Akademie jedoch 68, d. i. 16,5 Proz., also doppelt soviele, positiv befunden wurden. Wodurch sind diese Unterschiede veranlaßt? Wir haben bereits bei Besprechung der Unterschiede mit dem Material aus der Militärärztlichen Akademie erwähnt, daß an einigen Versuchstagen und zwar an 4 mit 145 Untersuchungen der Alexintiter dortselbst offenbar recht schlecht war, d. h. viel Alexin für die Aktivierung des gewöhnlichen hämolytischen Systems erforderlich war. An diesen 4 Tagen fanden sich, wie bereits hervorgehoben, unspezifische Hemmungen. An den gleichen Tagen zeigte sich auch die größte Differenz nach der Originalmethode. Bei uns waren nur 5 von diesen 145 Seren, d. i. kaum 3,5 Proz. positiv, an der Akademie 20, d. i. fast 14 Proz.; an 11 anderen Untersuchungstagen hingegen mit 266 Seren fanden sich bei uns 30 positive, d. i. 11,3 Proz., an der Akademie jedoch 48 positive, d. i. rund 18 Proz. Diese Gegenüberstellungen lassen ebenfalls erkennen, wie sehr der positive Befund nach der Originalmethode von der jeweiligen Höhe des Alexintiters abhängig ist. Diese Tatsache allein steht mit der Behauptung Wassermanns in Widerspruch, daß eine gleiche Durchführung der Originalmethode in verschiedenen Händen übereinstimmende Resultate verbürge.

Wie kam es nun, daß es bei Vergleichsuntersuchungen von 50 Seren im Wassermannschen Institute in Berlin und an der Kaiser-Wilhelms-Akademie gelang, fast völlig übereinstimmende Resultate zu erzielen? Dieses Resultat konnte nur nach Erfüllung einer Vor-

bedingung — gleich stark wirkendes Aktivserum — erreicht worden sein. Gleichheit des Extraktes und Gleichheit des Immunserums hielten wir, als nur schwachen Schwankungen unterworfen, für nebensächlich. So wurden an der dermatologischen Universitätsklinik und am Hygienischen Institute 89 Sera unter Verwendung desselben Aktivserums annähernd zur selben Zeit nach der Originalmethode untersucht und hiebei gefunden, daß bei 86 Seren völlig übereinstimmende Resultate sich fanden und nur 3 unterschiedliche Ergebnisse. In dem einen Fall war der Befund bei uns positiv, an der Klinik negativ; es handelte sich um ein Aortenaneurysma mit völlig einwandfreiem stark positivem Befund, während der Original-Wassermann an der Klinik negativ war. In diesem Fall muß irgend ein Versehen an der Klinik vorliegen, da auch die Nachwertung bei uns dasselbe Resultat ergab. Der 2. Fall war bei uns negativ, an der Klinik zweifelhaft, eine 2. Untersuchung fand nicht statt, und in dem 3. Fall war der Befund bei uns zweifelhaft (d. h. schwach positiv), an der Klinik jedoch positiv. Es ergibt sich daher, daß es uns ebenso hier in München wie in Berlin gelang, mit der Originalmethode fast völlig übereinstimmende Resultate zu erzielen, Resultate, die, abgesehen von dem 1. Fall, mit nur 2 kleinen Unterschieden in 88 Fällen besser sind, als die in Berlin mit 2 gleich großen Unterschieden bei nur 50 Fällen; aber dieses Resultat konnte nur bei Sicherstellung eines gleich wirkenden Aktivserums erreicht werden. Wenn daher Wassermann in seinen Schlußsätzen sagt, daß sich mit seiner Reaktion mit fast absoluter Sicherheit unter sich übereinstimmende Resultate ergeben, sofern sie von verschiedenen Untersuchungen auch völlig übereinstimmend ausgeführt werden, so trifft dies zu, aber die völlige Übereinstimmung der Untersuchungen muß sich auch auf ein gleichwirkendes Alexin erstrecken. Eine Gemeinsamkeit des Alexins ist jedoch an verschiedenen Instituten und an verschiedenen Untersuchungsstellen nur ausnahmsweise möglich. Die Gewinnung des Aktivserums wird gewöhnlich den Untersuchungsstellen überlassen bleiben müssen. Mit diesem Ausnahmsfall ist daher nicht zu rechnen, so daß nur der Schluß gezogen werden kann, die Methode müsse sich eben der

Veränderlichkeit des Aktivserums von Untersuchungstag zu Untersuchungstag anpassen.

Weitere Vergleichsuntersuchungen fanden in München mit der Kgl. bakteriologischen Untersuchungsanstalt statt. Diese gemeinsamen Untersuchungen umfaßten 250 Seren. Die Methodik an der Untersuchungsanstalt ist nicht genau die gleiche, wie nach der Originalmethode. Es wird ähnlich wie nach der Frankfurter Methode untersucht, aber ohne Extraktabstufungen und ohne Cholesterinzusatz. Eine Komplementaustitrierung findet insoweit statt, als die Aktivierungskraft in einer Vergleichsreihe annähernd bestimmt und die doppelte Lösungsmenge als Titer verwendet wird. Ein großer Komplementüberschuß und eine gewisse Anpassung an den jeweiligen Zustand des Aktivserums ist daher gewährleistet. Außerdem wird mit der sehr kleinen Gesamtmenge von nur 1 ccm gearbeitet. An Extrakten werden gewöhnlich 6 herangezogen, und zwar 1 unspezifischer und 5 spezifische Extrakte. Das Ergebnis war folgendes: Nach unserer Methode wurden 47 Sera, d. i. 19 Proz. positiv gefunden, nach der Methode der Anstalt 32, d. i. 13 Proz.; in 17 Fällen hatten wir ein positives Resultat und die Anstalt ein negatives, in 2 Fällen wir ein negatives und die Anstalt ein positives Resultat. Die Unterschiede sind kleiner, als sie nach der Originalmethode gefunden wurden. Diese Erscheinung ist wohl darauf zurückzuführen, daß eine gewisse Anpassung an den jeweiligen Komplementtiter beobachtet wurde.

2. Methoden mit abgestuften Serum- oder Extraktmengen.

Mit abgestuften Serummengen wird vor allem an den dänischen Instituten gearbeitet. Boas hat diese Methode im Jahre 1909 zum ersten Male vorgeschlagen. Die Methodik wurde bereits im allgemeinen geschildert, das Patientenserum wird meist abfallend in 5 Abstufungen von 0,2 bis 0,01 ccm verwendet, und wenn die Hemmung sehr stark ist, werden auch noch kleinere Dosen genommen. Ein weiteres Charakteristikum der Methodik liegt in der Verwendung der gerade noch mit der Extraktdosis lösenden Alexinmenge und schließlich in der Art der Ablesung der Resul-

tate mittels einer Hämoglobinskala. Die Bedenken, die wir gegen diese Methode äußern müssen, lassen sich bereits aus den früheren Ausführungen, namentlich über die Notwendigkeit der Konstanz der Extrakt- und Serummengen vermuten. Das Serum schränkt die lytische und hemmende Wirkung jedes Extrakte sein. Die Kraft dieser Einwirkung ist im allgemeinen proportional der Serummenge. Serumverdünnungen werden daher die reine Extraktwirkung im steigenden Maße zur Geltung gelangen lassen. Bei einer Methode mit Serumverdünnungen müssen sich daher teilweise zwei entgegengesetzte Wirkungen zeigen: bei normaler Serummenge eine Verringerung der Extraktwirkung und daher ein bestimmter Komplementüberschuß, bei fortlaufender Serumverdünnung wieder ein Ansteigen der Extrakthemmungswirkung bis zur Höhe der Alexintiterbestimmung und zugleich ein Schwinden des Komplementüberschusses. Die genaue Kenntnis dieser Verhältnisse haben wir erst in den letzten Monaten gewonnen. Aber bereits bei vergleichenden Untersuchungen in Teschen war es uns aufgefallen, daß nach der Boasschen Methode oft trotz glatter Lösung aller Kontrollen bei nur schwach positiven Seren unverhältnismäßig weit Spuren einer Hemmung nachgewiesen werden konnten, während unsere quantitative Methode einen viel kleineren Verbrauch an Komplementeinheiten anzeigte. Es wird dadurch bei weitgehender Verdünnung des Serums ein höherer Gehalt an spezifischen Stoffen vorgetäuscht, als er in Wirklichkeit vorhanden ist. Wertet man z. B. mit 0,1 ccm Patientenserum ein Serum aus, das nach unserer Methode einen Verbrauch von 4 KE. angezeigt hat, so ist dieser nach der Methode von Boas bei 0,05 Serum noch die Hälfte mit 2 KE., bei 0,0025 ein Viertel mit 1 KE., bei 0,001 Serum jedoch noch ½ KE., obwohl nur mehr Spuren vorhanden sein sollten, und selbst bei noch weiteren Verdünnungen sind noch lange Spuren einer Hemmung wahrzunehmen. Ein derartiges Serum müßte nach Boas als ein stark positives bezeichnet werden, und doch ist es bei einer Bindung von nur 4 KE. nach unserer Auswertung als ein mittelstarkes zu deuten.

In starkem Widerspruch mit Boas befinden wir uns hinsichtlich des Vorkommens einer Eigenhemmung im Patientenserum.

Für die Serumkontrollen verwendet Boas die eben noch total lösende Komplementmenge ohne Berücksichtigung des Extraktes. Seine Annahme ist richtig, daß bereits eine ganz geringe Eigenhemmung des Serums bei Verwendung dieses Komplementtiters zum Vorschein kommen müßte. Boas gibt jedoch an, daß nach seiner Erfahrung es nicht sehr häufig vorkomme, daß das Serum selbst hemmt. Dieser Angabe stehen unsere Erfahrungen gegenüber. Jedes Serum hemmt die Hämolyse, bzw. schützt die Blutkörperchen und bedingt einen höheren Alexinbedarf. Ein kleiner Komplementüberschuß verbirgt zumeist die Hemmung, aber in einem hohen Prozentsatz der Seren, und namentlich der luetischen Sera, sind stärkere Hemmungen zu finden, die eine besondere Methodik bei knappem Alexintiter verlangen, wie wir sie eben durch die Ausgestaltung der Serumkontrollen vorgeschlagen haben. In der nicht genügenden Berücksichtigung der Serumeigenhemmung liegt ein besonderer Fehler der Methode von Boas. Die Frage, ob die Verwendung einer Hämoglobinskala empfehlenswert ist, kann dahin beantwortet werden, daß der Übergang von Hemmung zur Lysis im hämolytischen System sich bei einem genügenden Überschuß von Immunserum scharf und eindeutig vollzieht, so daß die Hilfe einer Hämoglobinskala überflüssig erscheint. Nach der dänischen Methode kommt es freilich sehr häufig zu Spuren von Hemmung, die nur mit Hilfe der Hämoglobinskala genau bewertet werden können. Für Methoden jedoch wie die unsrige ist die Hämoglobinskala überflüssig.

Mit abgestuften Extrakten wird viel häufiger gearbeitet. Vor allem werden bei der von Frankfurt aus verbreiteten Methode von Sachs steigende Extraktmengen verwendet. Diese Methode jedoch hat ihre eigentümliche Prägung durch die Verwendung eines Cholesterinzusatzes zu Normal-Organextrakten, so daß wir sie in anderem Zusammenhang nach ihrer Leistungsfähigkeit besprechen wollen. Eine Reihe von Autoren, wie z. B. Sonntag, tritt für eine quantitative Bestimmung der Reaktion mit Hilfe von Extraktabstufungen ein, und ebenso Sormani. Die Methode beider Autoren, die einen bestimmten Anhängerkreis zu besitzen scheinen, unterscheidet sich jedoch wieder in wesentlichen Punkten:

Sonntag berücksichtigt bei der Bestimmung des Komplementtiters auch den Extrakt- und Serumzusatz, Sormani hingegen nur die Extrakthemmung. Noch wichtiger ist der Unterschied, daß Sormani beim Hauptversuch den einfachen Komplementtiter mit Berücksichtigung des Extraktes benützt, während Sonntag den doppelten Komplementtiter nimmt, um einen starken Überschuß des lösenden Priuzips zu besitzen. Im wesentlichen ist daher den beiden Methoden nur die Extraktabstufung gemeinsam. Die Einwände, die wir gegen derartige Abstufungen erheben müssen, sind bereits bei der Besprechung der Serumabstufungen angedeutet. Sie liegen im wesentlichen in dem Zwange, die Mengenverhältnisse zwischen Extrakt- und Patientenserum bei der quantitativen Auswertung nicht zu verändern, da jede solche Veränderung auf den Komplementtiter und damit auch auf den Ausfall der Reaktion von Einfluß sein kann. Besondere vergleichende Versuche mit der Methode von Sonntag haben wir nicht angestellt. Trotz der Komplementauswertung unter Berücksichtigung der Serum- und Extrakthemmung kann der Unterschied gegenüber der Originalmethode kein allzu großer sein. Interessant wären Vergleichsuntersuchungen nur insoweit, als der Komplement-(Alexin-)Überschuß stets ein gleichmäßiger ist (zum Unterschiede von der Originalmethode) und daher positive Reaktion gleichmäßig bei allen jenen Fällen auftreten muß, in denen das Serum wenig spezifische Stoffe enthält. Viel klarer liegen die Verhältnisse bei der Methode von Sormani. Hier ist der Komplementtiter samt Extrakt scharf bestimmt, und es ist verständlich, daß Sormani mit seiner Methode bereits vor Jahren im Verlaufe von 800 vergleichenden Untersuchungen mit der Originalmethode festgestellt hat, daß bei 15 Proz. der Sera die nach dem Original-Wassermann negativ reagierten, nach seiner Methode ein positives Resultat ergaben. Wir haben mit dieser Methode eine Reihe von Vergleichsversuchen ausgeführt. Es zeigte sich zunächst wieder, daß bei der Auswertung der Sera durch Extraktverdünnungen, ähnlich wie bei der Methode von Boas, oft noch bei weitgehenden Verdünnungsgraden positive Resultate gefunden wurden, die mit der genauen Bestimmung des Komplementver-

brauches nicht im Einklang standen. Häufiger noch ergab sich, daß viel schneller als bei Serumverdünnungen völlige Lösung eintrat. Die Gründe dieser letzteren Erscheinung sind zweifacher Art: Zunächst ist bei Extraktverdünnungen von einem proportionalen Geringerwerden der Extrakthemmungen, wie dies allgemein für Serumverdünnungen zutrifft, nicht die Rede. Die Hemmungen schwinden einmal plötzlich, ein ander Mal halten sie sich sehr lange; und anderseits können selbst bei weitgehenden Extraktverdünnungen noch immer spezifische Stoffe in einer Menge angedeutet werden, die mit der tatsächlich vorhandenen Menge nicht recht im Einklang stehen. Nach unseren ausgedehnten Extraktuntersuchungen kann nur noch einmal betont werden, daß, abgesehen von der erforderlichen Konstanz der Mengenverhältnisse zwischen Extrakt und Serum, der Extrakt schon durch seinen direkten Einfluß auf die Blutkörperchen ein viel zu unsicherer Faktor ist, als daß man ihn für eine quantitative Wertung benützen könnte. In kurzer Zusammenfassung könnte man für beide Methoden mit Serum- und Extraktabstufung sagen: Beide Methoden gehen von dem richtigen Ausgangspunkte — der Bestimmung der Minimaldosis an Komplement mit Berücksichtigung des Extraktes (allerdings ohne Serum) — aus, beide bringen jedoch mit diesen Abstufungen unsichere Faktoren in die quantitative Bestimmung herein, so daß Sera mit geringem Gehalt an spezifischen Stoffen leicht überschätzt, anderseits Sera mit hohem Gehalt leicht unterschätzt werden. Die Konstanz der Extrakt- und Serummengen ist ein so wichtiger Faktor für die quantitative Bestimmung, daß nur an die Verwendung aufsteigender Alexinmengen zur quantitativen Bestimmung gedacht werden kann.

3. Methoden mit Cholesterinzusatz.

Scheinbar viel wichtiger als diese Methoden ist die Verwendung von Cholesterin im Verein mit Abstufungen unspezifischer Extrakte oder Cholesterinzusatz zur Verschärfung der qualitativen Originalmethode. Diesem Zusatz wird größte Bedeutung zugemessen. So sagt Pöhlmann, daß es Sachs durch Hinzufügen von Cholesterin zu alkoholischen Extrakten aus Meerschweinchen

und Rinderherzen gelang, deren Wirksamkeit derart zu erhöhen, daß sie den besten Extrakten aus luetischen Lebern gleichwertig wurden. Eine Reihe von Autoren erhielten mit Cholesterin-Organextrakten sehr gute Resultate. Nur Boas und Leschly finden, daß zwar eine verstärkte Wirkung, aber auch unspezifische Hemmungen aufzutreten pflegen. Über die Wirkung des Cholesterins auf die verschiedenen Extrakte und die Bedeutung des Serumzusatzes haben wir bereits in einem anderen Abschnitt gesprochen. Ein Cholesterinzusatz vermindert tatsächlich, wie dies bereits Altmann angegeben hat, die Eigenhämolyse der Extrakte, aber zugleich wird die Eigenhemmung stark erhöht. Diesem Umstand ist es zuzuschreiben, daß der Cholesterinzusatz bei allen Methoden, die die Bestimmung des Komplementtiters vernachlässigen, eine beträchtliche Zunahme der Extrakteigenhemmung und damit einen Mehrverbrauch an Alexin bewirken. Vergleichende Serumauswertungen haben uns in vereinzelten Fällen schon früh erkennen lassen, daß der Cholesterinzusatz zum Extrakt bei negativen Seren Hemmungen erzeugt. Bei der praktischen Bedeutung dieser Frage haben wir mit Seren aus der Universitätsklinik von Professor Zumbusch im großen Umfang vergleichende Versuche angestellt. Insgesamt wurden 338 Sera von uns nach unserer Methode mit einem unspezifischen und mit einem spezifischen Extrakt ausgewertet, und an der Klinik mit dem gleichen spezifischen Extrakt, einmal ohne und einmal mit Cholesterinzusatz nach der Originalmethode. Bei diesen 338 Seren ergaben sich zunächst für die Untersuchungen an der Klinik allein folgende Unterschiede: Bei 90 Sera verursachte der Cholesterinzusatz bei Original-Wassermann einen Unterschied; 31 waren ohne Cholesterinzusatz negativ, mit Cholesterin glatt positiv; 20 Sera ergaben ohne Cholesterin ein zweifelhaftes Ergebnis, mit Cholesterin ein positives, und bei 39 Seren war das Resultat ohne Cholesterin negativ, mit Cholesterin zweifelhaft. Die bereits früher hervorgehobene Wahrnehmung, daß der Cholesterinzusatz bei einer Methode wie die Originalmethode durch den erhöhten Komplementverbrauch die Resultate wesentlich verschiebt, ist daher vollauf bestätigt. Der Vergleich mit den Resultaten nach unserer Methodik

wird vielleicht ein Urteil über die Berechtigung dieses Cholesterinzusatzes gewähren. Von den 338 Seren waren nach unserer Methode 58 Sera positiv; von diesen 58 ergaben an der Klinik Zumbusch nach Original-Wassermann ohne Cholesterin 19, d. i. 32 Proz. ein zweifelhaftes, 39, d. i. 67 Proz. ein positives Resultat; mit Cholesterinzusatz hingegen lieferten 16 ,d. i. 27 Proz. ein zweifelhaftes und 42, d. i. 72 Proz. ein positives Ergebnis. Der Unterschied in den positiven Resultaten mit und ohne Cholesterinzusatz ist daher nur unbedeutend. Selbst nach Zusatz von Cholesterin waren nach der Originalmethode nur 42 positiv, nach unserer Methode jedoch 58. Von 10 Sera, die nach unserer Methode ein zweifelhaftes Ergebnis hatten, waren nach der Originalmethode an der Klinik 2 zweifelhaft und 8 negativ, mit Cholesterinzusatz 8 zweifelhaft und 2 negativ. Schließlich waren von 23 Sera, die bei uns negativ waren, auch an der Klinik ohne Cholesterinzusatz alle negativ, mit Cholesterinzusatz jedoch 19, d. i. 82 Proz. zweifelhaft und 4, d. i. 17 Proz. positiv. Dieses letzte Ergebnis ist für die Beurteilung der Wirkung des Cholesterins von größter Bedeutung. Sicher negative Sera geben mit Cholesterin positive Reaktion.

B. Methoden mit nicht inaktiviertem (Aktiv-) Serum.

Die wichtigsten Methoden, die mit nicht aktiviertem Serum arbeiten, wurden bereits im Abschnitt II A besprochen. Sachs und Altmann, sowie Landsteiner und Müller fanden ungefähr zur gleichen Zeit, daß das Serum, wenn man es aktiv verwendet, stärkere Reaktionen zeigt, als nach dem Inaktivieren. Man erklärte sich diese Wahrnehmung mit einer Schädigung der spezifischen Stoffe im Serum (Luesreagine) oder ihres Bindungsvermögens durch die Erhitzung auf 56°. Denn würde dies nicht zutreffen, so müßte eigentlich die Zahl der positiven Befunde in aktiven Seren kleiner sein, da bei diesen außer dem im Meerschweinchenserum enthaltenen Komplement noch das Eigenkomplement im Patientenserum hinzukommt. In vergleichenden Untersuchungen hat namentlich M. Stern[1]) nachgewiesen, daß z. B. von 300 Seren nach der Aktivmethode 130 positiv waren,

1) Z. f. I. Bd. I, 1909.

nach der Originalmethode jedoch nur 94. Von dem Plus an 36 positiven Fällen konnten 32 klinisch als sichere Syphilis bezeichnet werden. Ähnliche Unterschiede fanden auch Seligmann und Pinkus[2]). An den deutschen Untersuchungsstellen hat sich die Aktivmethode nur wenig einbürgern können. Wassermann hat gegen die Verwendung eines Aktivserums namentlich geltend gemacht, daß nach seinen Erfahrungen frische Sera von Fällen schwerer Infektionskrankheiten häufig unspezifische Hemmungen zeigen. Wassermann folgerte hieraus die praktische Regel, daß man keine der Methoden, die nur mit nicht erhitztem Serum arbeiten, für sich allein verwenden dürfe. Unseres Wissens wird nur an der dermatologischen Universitätsklinik in Breslau mit inaktiven und aktiven Sera in größerem Umfange untersucht. Doch auch dort wird eine besondere Vorsicht dadurch geübt, daß bei inaktiviertem Sera 5 Extrakte, bei nicht inaktivierten 3 Extrakte Verwendung finden. In Österreich, namentlich in Wien, wird eine besondere Methodik mit aktivem Serum in größerem Umfange angewendet, die von Landsteiner und Müller herstammt. Müller hebt in seiner Schrift (S. 32) hervor, daß er selbst im Jahre 1908 vor der Verwendung eines aktiven Serums zur Wassermannschen Reaktion warnte, weil die Gefahr unspezifischer Hemmungen sehr groß erschien. In der Folge jedoch gelang Landsteiner und Müller, wie es in der Schrift heißt, die Bestimmung jener Dosen, die den Vorteil des Arbeitens mit aktivem Serum bieten, ohne in die gefährliche Nähe der Unspezifität zu gelangen. Für die Ausarbeitung dieser Methode mußte eine entsprechende Anpassung von Blut-, Ambozeptor-, Komplement- und Kochsalzlösung empirisch gefunden werden. Als Prinzip der Methodik bezeichnet Müller: quantitatives Arbeiten durch Steigerung der Extraktdosis, Verwendung zweier unspezifischer Extrakte ,von denen der eine empfindlicher ist (*C*- und *N*-Extrakt). Außerdem wird nebst Einstellung der üblichen Kontrollen der Einfluß der Alkoholkomponente des Extraktes auf die Versuchsresultate geprüft. Auf Einzelheiten dieser Methodik haben wir bereits früher hingewiesen. Müller bediente sich bei

2) Z. f. I. Bd. V.

der Durchführung ausschließlich der Tropftechnik, über deren Vorzüge und Nachteile die Meinungen recht geteilt sind. Bei der größeren Verbreitung dieser Methodik müssen wir uns etwas ausführlicher mit den charakteristischen Merkmalen derselben beschäftigen. Vor allem ist die Frage zu erörtern, ob die verschiedenen Bedenken gegen die Aktivmethoden volle Berechtigung besitzen. Wir haben eine größere Zahl von vergleichenden Auswertungen mit aktiven und nicht aktiven Seren vorgenommen. An der Untersuchungsstelle in Teschen wurden 474 Sera aktiv und nicht aktiv untersucht und hiebei im inaktiven Zustand 265, im aktiven 244 Fälle positiv gefunden. Der Unterschied gegenüber den aktiven Seren mit einem Mehr von 21 positiven Befunden ist nicht unbedeutend. In München wurden 112 Sera aktiv und inaktiv untersucht und hiebei im inaktivierten Zustand 48, im aktiven Zustand 40 positiv befunden. Das Ergebnis stimmt daher mit den Befunden in Teschen überein.

Nach diesen Versuchen reagieren im erhitzten Zustand mehr Sera positiv als im unerhitzten. Dies steht in starkem Widerspruch mit allen bisherigen Angaben.

Prüft man die einzelnen positiven Befunde in Teschen auf den Grad des Komplementverbrauches, d. h. auf die Zahl der verbrauchten KE., so stellt sich heraus, daß von den positiven Seren 55 im inaktivierten Zustand einen höheren Komplementverbrauch zeigten als im unerhitzten, während 89 unerhitzt mehr Komplementeinheiten banden, als nachdem sie erhitzt waren. Der Ausfall ist daher bei 36 Proz. der aktiven Sera mit positivem Befund stärker und bei 23 Proz. der inaktivierten. Eine Prüfung der nur im erhitzten Zustande positiven Sera ergbb, daß bei diesen nur ein Komplementverbrauch bis 2 KE. nachzuweisen war. Mit dieser Feststellung ist die Sachlage geklärt. Da man bisher mit wenig empfindlichen Methoden arbeitete, konnten diejenigen positiven Fälle, die nur einen geringen Komplementverbrauch veranlassen, überhaupt nicht als positiv erkannt werden, während nach unserer Methode alle wirklich vorhandenen Bindungen klar als solche in die Erscheinung treten. Dieser Befund ist wichtig. Denn es kommt vor allem darauf an, ob ein Serum

überhaupt positiv reagiert und viel weniger darauf, ob ein oder zwei KE. mehr oder weniger verbraucht werden.

Der Grund, daß schwach positive Sera im unerhitzten Zustande vielfach nicht erkannt werden, liegt vorwiegend in dem Vorhandensein des Eigenkomplements dieses Serums. Die Bemerkung Wassermanns, daß man theoretisch im nicht erwärmten Serum weniger positive Befunde finden sollte als im erhitzten, da im ersteren ein Plus an Komplement durch das Komplement des Patientenserums vorhanden sei, war sehr berechtigt und steht im völligen Einklang mit unseren vergleichenden Untersuchungen. Wir haben insgesamt 202 unerhitzte Sera auf Eigenkomplement untersucht und hiebei festgestellt, daß die positiven Sera im Mittel $^{47}/_{100}$ einer KE. Eigenkomplement besaßen, die negativen $^{45}/_{100}$. Es ist daher zwischen den positiven und negativen Seren hinsichtlich der Menge des Eigenkomplements kein Unterschied vorhanden. Zu betonen ist, daß von diesen 202 Seren 8 = 4 Proz. kein Eigenkomplement erkennen ließen — eine Erscheinung, die wir bei der Untersuchung mehrerer hundert Meerschweinchenseren niemals finden konnten. Es scheint daher nicht berechtigt, eine Methode auf das Eigenkomplement im Menschenserum aufzubauen, wie dies von Hecht und Stern geschah. Der Komplementgehalt des Menschenserums ist auch, abgesehen von den negativen Fällen, ziemlich schwankend, von etwa $^{2}/_{10}$ KE. bis zu $^{9}/_{10}$ KE. Der Gehalt an Eigenkomplement bleibt in den Seren auch nur kurze Zeit bestehen. Versuche nach dieser Richtung ließen erkennen, daß bereits 2 und 3 Tage nach der Blutentnahme das Eigenkomplement geschwunden ist. Diese Sera zeigen dann bald eine Eigenhemmung, wie sie sich recht häufig bei den künstlich inaktivierten Seren findet. Untersucht man fortlaufend aktive Sera auf ihre Komplementbindung, so kann man finden, daß mit dem Schwinden des Eigenkomplements der Komplementverbrauch bei der Auswertung entsprechend dem Geringerwerden der Eigenkomplementmenge in die Höhe geht.

Der Komplementgehalt der Menschensera hat vor letzter Zeit Mandelbaum[1]) zu weitgehenden serologischen und klinischen

1) Münch. med. W. Nr. 29 von 1916.

Schlüssen veranlaßt. Mandelbaum stellte in Verdünnungen von 0,25 ccm, 0,125 ccm, 0,0625 ccm, 0,0313 und 0,0157 ccm Serum durch hämolytische Versuche den Komplementgehalt fest und fand als Resultat von Hunderten von Untersuchungen an gesunden und kranken Menschen, daß die absolut lösende Dosis des Menschenserums bei 0,06 ccm liege. Er sagt nun kurz: Der Komplementtiter des Serums jedes erwachsenen Menschen ist unmittelbar nach der Blutentnahme der gleiche. Diese Angabe ist nicht ganz richtig. Wir haben allerdings bei mehreren Hunderten von Menschenseren einen ähnlichen Mittelwert zwischen 0,04 und 0,05 ccm gefunden, aber dieser ist das Mittel von Streuungen vom Fehlen des Komplements einerseits und bis zu einem Werte von 0,09 anderseits. Nimmt man so große Abstufungen des Serums, wie dies Mandelbaum tat, dann können diese feineren Schwankungen allerdings nicht festgestellt werden; aber bei etwa 10 Abstufungen von 0,1 bis 0,01 Serum treten die Unterschiede schön zutage. Es liegt daher kein Grund für die Annahme vor, daß das Komplement im Menschenserum sich anders verhalte wie die in den verschiedenen Tierseren, namentlich auch im Meerschweinchenserum. Der mittlere Gehalt an Komplement mit 0,05 im Menschenserum ist nur etwa ein Drittel des mittleren Gehaltes im Meerschweinchenserum mit 0,15. Von einer Konstanz des Eigenkomplementgehaltes im Menschenserum kann keine Rede sein.

Nur flüchtig wollen wir noch streifen, daß auch die anderen Angaben Mandelbaums — regelmäßige Abnahme des Eigenkomplements im Menschenserum bei bestimmten Erkrankungen wie Tuberkulose, Scharlach und Lues — und deren diagnostische Verwertung einer sorgfältigen Nachprüfung bedürfen, da das regelmäßige Auftreten der Eigenhemmung nach Schwinden des Komplements genau berücksichtigt werden muß. Die Unterschiede im Komplementgehalt der positiven luetischen und der normalen Sera sind nach unseren Versuchen so gering, daß es sehr fraglich ist, ob die Angabe Mandelbaums richtig sein kann, daß bei ungefähr 55 Proz. der positiv luetischen Sera bereits 0,25 ccm Serum hemmend wirken, bei normalen Seren jedoch nicht.

Auf dieser Annahme begründet Mandelbaum das Verlangen, neben der Wassermannschen Reaktion die verdächtigen Sera auch auf diese Hemmungswirkung zu prüfen.

Auf Grund unserer eingehenden vergleichenden Untersuchungen von aktiven und inaktivierten Seren können wir in der Verwendung des Aktivserums keinen Vorzug erblicken, im Gegenteil, die Zahl der positiven Befunde ist bei inaktivierten Seren größer, die Sera sind in diesem Zustand haltbarer und atypische Hemmungen kommen bei inaktivierten Sera so gut wie nicht vor. In eine Erörterung der Frage, ob bei verschiedenen Infektionskrankheiten bei Verwendung von aktiven Seren unspezifische Hemmungen leichter vorkommen, können wir nicht eintreten, da wir zu wenig Erfahrungen nach dieser Richtung besitzen. Es scheint uns nur, daß bei dem Hinweis auf unspezifische Hemmungen oft die Serumeigenhemmung nicht genügend berücksichtigt wurde.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal der Methode von Müller und Landsteiner ist die Verwendung von zwei verschiedenartigen unspezifischen Extrakten. Der eine „Extrakt" ist ein gewöhnlicher alkoholischer Rinderherzextrakt (*C*-Extrakt). Sein sogenannter *N*-Extrakt ist aus diesem durch Eindampfen im Wasserbade bis zur Hälfte und Auffüllung auf das fast ursprüngliche Volumen mit physiologischer Kochsalzlösung mit einem Zuschlag von rund 10 Proz. Salzlösung bereitet. In diesem *N*-Extrakt, der fast alkoholfrei ist, wird wegen der günstigeren physikalischen Zustandsbedingungen ein besonderer Vorzug erblickt. Dieser Extrakt soll trotz der geringeren Lipoidmenge die Ausfälle der Reaktion bei Luetikern verstärken, bei Nichtluetikern Pseudoreaktionen jedoch zum Schwinden bringen. Besonderen Wert legt Müller auf die Art der Erhitzung, des Zusammengießens und des Aufbewahrens dieses Extraktes. Wir müssen auf die wahrscheinlichen Ergebnisse der Einengungsprozedur eines alkoholischen unspezifischen Organextraktes genauer eingehen. Müller spricht selbst vielfach von der besonderen Wirkung der Alkoholkomponente im Extrakt. Auf die Trennung der Wirkung beider Komponente in alkoholischen Extrakten: Extrakt und Alkohol allein

haben wir in unseren Untersuchungen ganz besonderes Gewicht gelegt. Die Ergebnisse wurden bereits im Abschnitt II B, 4 und II D, 1 besprochen. Der Alkohol an sich hat eiweißfällende, lytische und hemmende bzw. schützende Wirkung auf die Blutkörperchen; ebenso auch der alkoholfreie Extrakt allein. Die Extraktwirkung zeigt nur Unterschiede in der Zonenverteilung in der Art, daß z. B. die eiweißfällende Zone von bestimmten Extraktabstufungen an fehlt und dementsprechend die lytische Zone bzw. die wirkungslose Zone bis zu größeren Extraktmengen heranreicht.

Wesentlich für die reine Extraktwirkung ist die Erscheinung, daß nach Serumzusatz die eiweißfällende und hämolytische Wirkung des Extraktes weitgehend aufgehoben ist, so daß bei vielen unspezifischen Rinderherzextrakten Mengen bis 0,6 ccm keine Giftwirkung mehr gegenüber den Blutkörperchen aufweisen. Der Vorzug des Müllerschen *N*-Extraktes würde genau so wie der des Lesserschen Ätherextraktes darin liegen, daß er frei von der hämotoxischen Wirkung der Alkoholkomponente ist und die spezifische Bindungskraft zeigen kann. Diese Schlüsse sind bereits aus unseren Extraktstudien abzuleiten. Wir haben, um nochmals eine Bestätigung dieser Anschauung zu erhalten, besonders vergleichende Untersuchungen vorgenommen. Die Art dieser Untersuchungen und deren Ergebnis soll in der nächsten Tabelle gebracht werden.

Im oberen Teil der Tabelle sind zunächst an der linken Seite in der Vorwertung die Extraktabstufungen angegeben, und dann in 6 Kolonnen die Wirkungen dieser Extrakt- bzw. Alkoholmengen auf das hämolytische System zum Ausdruck gebracht. In der ersten Säule ist die Wirkung des gewöhnlichen unspezifischen Rinderherzextraktes zu sehen. Von 0,25 bis 0,1 Extrakt ist eine abnehmende Hemmungswirkung wahrzunehmen, dann ist Lysis eingetreten. Derselbe Extrakt, in denselben Mengen 1 Stunde bei 56° erwärmt, zeigt genau dieselben Verhältnisse. Diese Art Inaktivierung haben wir gewählt, um darzutun, daß eine gelinde Erwärmung des Extraktes, die auf die Menge und deren Alkoholgehalt noch keinen wesentlichen Einfluß übt,

Vorwertung.

H. S.	Alexin-Titer	NaCl	Extrakt bzw. Alkohol	Unspezifischer Extrakt UA_2			Alkohol 96 %		
				α) gewöhnlich	β) inaktiv 1 h 56°	γ) »N«-Extrakt	α) gewöhnlich	β) inaktiv 1 h 56°	γ) »N«-Extrakt
1ccm	0,1		0,25	cH	cH	L	sH	dH	L
»	0,1		0,20	fcH	fcH	L	ssH	sH	L
»	0,1	bis	0,15	sH	sH	L	ssH	ssH	L
»	0,1	auf	0,10	ssH	ssH	L	L	L	L
»	0,1	2,5	0,08	L	L	L	L	L	L
»	0,1	ccm	0,06	L	L	L	L	L	L
»	0,1		0,04	L	L	L	L	L	L
»	0,1		0,02	L	L	L	L	L	L

Hauptwertung.

Gesamtmenge 2,5 ccm		Mit 0,1 ccm positivem Serum					
H. S. 1 ccm		Extraktabstufungen in ccm					
Aktivserum 1:10 vom Titer an		0,2	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005
A. Unspezifischer alkoholischer Extrakt UA_2 α) gewöhnlich.							
I	0,1 ccm	fcH	fcH	fcH	fcH	dH	dH
II	0,2 »	fcH	sH	L	L	L	L
III	0,3 »	fcH	ssH	L	L	L	L
IV	0,4 »	dH	L	L	L	L	L
B. Derselbe Extrakt UA_2 β) inaktiviert 1 Stunde bei 56°.							
I	wie oben	fcH	fcH	fcH	fcH	fcH	fcH
II	» »	dH	sH	ssH	L	L	L
III	» »	sH	L	L	L	L	L
IV	» »	ssH	L	L	L	L	L
C. Von demselben Extrakt UA_2. Herstellung des sogenannten »N«-Extraktes nach Müller.							
I	wie oben	fcH	ssH	ssH	ssH	sH	ssH
II	» »	L	L	L	L	L	L
III	» »	L	L	L	L	L	L
IV	» »	L	L	L	L	L	L
D. Spezifischer Extrakt Ia.							
I	wie oben	cH	cH	cH	cH	cH	cH
II	» »	cH	cH	cH	cH	cH	fcH
III	» »	cH	cH	cH	cH	fcH	dH
IV	» »	cH	fcH	fcH	fcH	dH	sH

auch keine Unterschiede gegenüber einem unerhitzten Extrakt aufweist.

In der III. Reihe ist derselbe Extrakt, aber nach dem Einengungs- bzw. Verdünnungsprozeß nach Müller, in Verwendung. Der Unterschied gegenüber den beiden andern Säulen ist ganz offenkundig. Die Hemmungszone ist verschoben. Selbst 0,25 des verdünnten Extraktes ergab klare Lysis.

Auf der rechten Seite der Vorwertung ist die Wirkung des 96proz. Alkohols in denselben 3 Formen zur Darstellung gebracht.

Die 1. und 2. Säule zeigen in den oberen Extraktstufen bestimmte Hemmungserscheinungen, die aber weniger weit reichen als bei den alkoholischen Organextrakten. Nach Müller eingeengt und verdünnt, ist in der letzten Reihe durchwegs Lysis zu sehen; es ist eben nur reine physiologische Kochsalzlösung.

Nun haben wir in ähnlichen Extraktabstufungen auch in diesen 3 Formen eine Auswertung eines positiven Serums vorgenommen (Hauptwertung). Die obere Gruppe dieser Hauptwertung zeigt die Wirkung der Extraktabstufungen ohne irgendwelchen Eingriff. Nur 0,2 Extrakt läßt eine stärkere Hemmung bis zu 0,4 ccm Aktivserum, also der 4fachen Alexintitermenge erkennen. In den folgenden Extraktstufen tritt schnell eine Abnahme ein; von 0,05 Extrakt an jedoch bleibt die Hemmung selbst bis 0,005 Extrakt ziemlich gleich. Die 2. Gruppe mit dem inaktivierten Extrakt läßt gegenüber der ersten so gut wie keine Veränderung erkennen, bei der 3. Gruppe mit dem nach Müller eingeengten und verdünnten Extrakt ist die Wirkung abgeschwächt. Die Wirkung der Alkoholkomponente ist beseitigt, selbst bei der größten Extraktmenge ist nur im 1. Röhrchen fast komplette Hemmung festzustellen. Diese Hemmung bleibt jedoch, wenn auch nur in Spuren bis zu weitgehenden Extraktverdünnungen bestehen. Schließlich haben wir in einer 4. Gruppe, um den Kontrast eines guten spezifischen Extraktes darzustellen, auch eine Serumauswertung mit einem solchen vorgenommen, aus der zu erkennen ist, daß bis etwa 0,025 Extrakt die spezifische Hemmung fast unverändert besteht und dann erst ganz allmählich abzusinken beginnt. Der Unterschied in der Wirkung der spezifischen und unspezifischen Extrakte springt

hier besonders in die Augen. Für die Beurteilung des Müllerschen N-Extraktes ergibt sich, daß seine Wirkung eine reine Extraktwirkung ist. Der N-Extrakt weist nicht ein Mehr an spezifischer Bindung auf, sondern besitzt lediglich die gute Eigenschaft, selbst in größeren Mengen keine unspezifische Hemmungen zu zeigen. Die Angabe Müllers, daß mit dem C-Extrakt schwach positive oder zweifelhafte Sera mit dem N-Extrakt stark positiv werden, ist so zu deuten, daß der Überschuß an Alkohol bei größeren Extraktdosen eine lytische Wirkung auf die Blutkörperchen ausübt, während der Extrakt allein die spezifische Bindung rein zum Ausdruck bringt. Diese Klärung der Wirkungsweise der C- und N-Extrakte hat im allgemeinen erkennen lassen, daß der Unterschied in den Reaktionsausfällen nach der Müllerschen Methode durch die Verwendung überflüssig hoher Extraktdosen bedingt ist. Wir haben schon wiederholt darauf hingewiesen, daß auch unspezifische Extrakte in Mengen von 4 Tropfen = 0,2 ccm oder 6 Tropfen = 0,3 ccm sehr häufig lytische Wirkung auf die Blutkörperchen erkennen lassen und in diesen Mengen überhaupt nicht verwendet werden sollen. Müller gibt aber sogar eine besondere ansteigende Antigenkontrolle an, in der bis zu 30 Tropfen Antigen genommen werden. Der Wert einer derartigen Kontrolle ist nicht einzusehen. Die allgemeine Verwendung so hoher Extraktmengen bedeutet auch bei den Mengenverhältnissen der Müllerschen Methode eine Gefahr. Wir sind dieser Methode möglichst weitgehend nachgegangen. So wurden im ganzen 112 Sera genau nach der Vorschrift von Müller mit einem gewöhnlichen unspezifischen Extrakt in den vorgeschriebenen Mengen im Vergleich mit unserer Methode und mit der Original-Wassermann untersucht. Das Ergebnis war in den wesentlichsten Punkten folgendes: Von 63 Seren, die nach unserer Methode und nach der Originalmethode negativ waren, und bezüglich deren auch klinisch keine Anhaltspunkte für Syphilis vorlagen, ergaben 15 nach der Müllerschen Methode positive Reaktionen und 48 zweifelhafte Resultate. Gewöhnlich war die Reaktion mit 4 Tropfen Extrakt schwächer als mit 6 Tropfen, aber bei 7 Sera konnte bei 0,2 Extrakt schwache Hemmung gefunden werden, bei 0,3 Extrakt

glatte Lysis. Diese Ergebnis ist so zu deuten, daß die großen Extraktmengen unspezifische Hemmungen hervorrufen. Der Wegfall dieser Hemmung bei der großen Extraktmenge in diesem besonderen Fall hängt mit der höheren lytischen Kraft dieser größeren Mengen zusammen. Im allgemeinen stimmt das Ergebnis bei der Müllerschen Methode mit dem Original-Wassermann, aber nicht mit unserer schärferen Methode zusammen. Bei 22 Seren jedoch war der Befund nach unserer Methode positiv, nach der Original-Wassermann negativ, während nach der Wiener Methode 9 positiv und 12 zweifelhaft reagierten. Diese Vergleichsuntersuchungen an 112 Sera wurden durchwegs mit inaktiviertem Serum angestellt; dies mußte für München aus technischen Gründen geschehen. Der methodische Wert der Vergleichsuntersuchungen ist hierdurch in keiner Weise beeinträchtigt. In Teschen haben wir in einigen hundert Fällen mit Aktivserum vergleichende Untersuchungen mit unserer Methode, der Original- und der Müllerschen Methode angestellt. Die nächste Tabelle soll einigeBeispiele bringen.

Wir sehen in dieser Tabelle zunächst wieder den verschiedenen graduellen Ausfall der Reaktion bei Verwendung eines inaktiven und aktiven Serums, von dem wir früher ausführlicher gesprochen haben. Im übrigen gibt die Müllersche Methode mit Aktivserum wieder häufiger positive Resultate als der Original-Wassermann, aber auch wieder, wie wir namentlich bei den letzten 4 Sera beim Vergleich mit unserer Methode sehen, auch häufig unspezifische Hemmungen. Es wären noch eine Reihe anderer Bedenken mehr grundsätzlicher Art gegen die Verwendung der Müllerschen Methode zu erörtern, wie der nicht ganz genügende Überschuß an Immunserum, der Wegfall der Sensibilisierung der Blutkörperchen usw. Hier war es aber nur notwendig, die entscheidenden Charakteristika der Müllerschen Methode und aller Aktivmethoden kritisch zu beleuchten. Zusammenfassend müssen wir sagen, daß die Verwendung aktiver Sera keinen Vorteil bietet, im Gegenteil durch das Vorhandensein eines dem Gehalt nach wechselnden Eigenkomplements oft gerade schwach positive, klinisch wichtige Fälle nicht erkennen läßt und nicht selten zu einem atypischen Verlauf der Reaktionen führt.

Nr.	inaktiv		aktiv		Nr.	inaktiv		aktiv	
	Unsere Methode	Original-Wa.-R.	Unsere Methode	Wa.-Methode		Unsere Methode	Original-Wa.-R.	Unsere Methode	Wa.-Methode
305	über 4 KE	c H	über 4 KE	a) c H b) c H	1012	1/3 KE	L	1 KE	c H ss H
315	1 KE	L	3 KE	L L	1004	1/2 KE	L	1/2 KE	s H L
299	1/3 KE	L	2 KE	L L	1087	1 1/2 KE	L	1 1/2 KE	L L
310	1/3 KE	L	L	L L	1088	1 1/2 KE	L	1 1/2 KE	c H L
457	3 KE	L	5 KE	c H d H	1089	neg.	L	neg.	L L
463	4 KE	L	4 KE	c H d H	1090	neg.	L	1 1/2 KE	L L
415	1 KE	L	3 KE	c H c H	511	1/2 KE	L	neg.	L L
417	1/2 KE	L	3 KE	c H c H	1052	1/2 KE	L	neg.	s H L
424	1/2 KE	L	1 KE	c H c H	1062	1/3 KE	L	neg.	d H L
427	neg.	L	neg.	L L	1063	1/3 KE	L	neg.	c H L

C. Spezifität und Empfindlichkeit unserer Methodik.

1. Spezifität.

Nach all den vergleichenden Untersuchungen wollen wir nun im Zusammenhang den Haupteinwand, der stets gegenüber dem Befund einer größeren Zahl von positiven Reaktionen erhoben wird, die Frage der Spezifität ausführlich erörtern. Bekanntlich hat es ziemlich lange gedauert, bis die Frage der Spezifität der Wassermannschen Reaktion für Syphilis einigermaßen geklärt war. Die allgemeine Ansicht geht nun dahin, daß die Reaktion für Syphilis zwar nicht absolut spezifisch, aber doch in weitem Maße als charakteristisch bezeichnet werden kann. Die ursprüngliche Annahme Wassermanns, daß die Reaktion eine echte Antigen-Antikörperreaktion sei, ist durch die erfolgreiche Verwendung unspezifischer Extrakte stark erschüttert worden.

Wenn jedoch von einigen Autoren noch zäh an der Antigen-Antikörperauffassung festgehalten wird, so hat dieser Standpunkt, wie wir namentlich durch unsere quantitativen Vergleichsuntersuchungen mit spezifischen und unspezifischen Extrakten nachweisen konnten, doch insoferne eine gewisse Berechtigung, als die spezifischen Extrakte stärker wirken als die nicht spezifischen. Ob es sich dabei um streng spezifische Stoffe handelt, wird vielleicht noch durch weitgehende Untersuchungen festgestellt werden können. Anderseits ist es jedoch sicher, daß die reagierenden Stoffe im luetischen Serum eine große Affinität für Lipoide besitzen und aus diesem Grunde auch durch lipoidhaltige Extrakte aus normalen Organen nachgewiesen werden kann. Ähnliche Stoffe scheinen jedoch auch bei manchen anderen Erkrankungen, namentlich bei exotischen Protozoenerkrankungen und bei schwer konsumptiven Erkrankungen vorhanden zu sein.

So ist bekannt, daß bei Malaria wiederholt positive Reaktion gefunden wurde. Vielfach wird behauptet, daß auch bei Scharlach hie und da eine positive Wassermannsche Reaktion nachzuweisen ist. Auf diese Erscheinung haben zuerst Much und Eichelberg aufmerksam gemacht. Sie hatten unter 25 Scharlachpatienten in 10 Fällen eine positive Reaktion gefunden. Später erhielt Much in 100 Scharlachfällen sogar 45 positive Resultate. Da die beiden Autoren jedoch 0,3 und 0,4 Serum verwendeten, hegte man mit Recht Zweifel an der Richtigkeit dieser Resultate. Insgesamt liegen nach Boas Scarlatina-Untersuchungen von 12 Autoren in 617 Fällen vor mit 6 Proz. positiven Befunden. Nachprüfungen von Boas ergaben bei 61 Scharlachkranken nur in einem Falle positive Reaktion. Auch Müller fand in über 60 Fällen nur eine einzige bald verschwindende Reaktion. Noch weniger konnten die Angaben von positiven Befunden bei Lungenschwindsucht und Lungenentzündung standhalten. Bei beiden Erkrankungen behaupteten Weil und Braun, in nicht wenigen Fällen eine positive Reaktion gefunden zu haben. Boas untersuchte 300 Phthisiker und fand 3 positive Fälle; aber genaue anamnestische Erhebungen stellten bei allen drei Personen latente Syphilis fest. Auch bei 2 Personen, die positiv reagierten, von

48 Pneumoniepatienten, wurde latente Syphilis ermittelt. Ein gleiches Schicksal widerfuhr den Angaben von Weil und Braun für bösartige Geschwülste. Hier konnte Boas bei 59 Untersuchungen in keinem Falle eine positive Reaktion finden. Anderseits jedoch wieder gibt Müller an, daß er unter 200 Fällen von Karzinom in 3 schweren Fällen komplette positive Reaktion feststellen konnte. Auch bezüglich anderer Krankheiten liegen vereinzelte Angaben über positive Befunde vor. Sehr wichtig ist eine Zusammenfassung von Boas über Untersuchungen von 1927 Personen mit den verschiedensten Krankheiten, wobei nur bei 5 eine positive Reaktion ermittelt werden konnte und zwar bei 1 Leprapatienten, 1 Scarlatinapatienten und 3 narkotisierten Patienten. Unter einer noch größeren Zahl von Fällen und zwar bei über 5000 fand hingegen Müller bei nicht weniger als 220, d. s. 4,4 Proz. inkomplette, also meist nur sehr schwache positive Reaktion. Diese Unterschiede in den Befunden zwischen Boas und Müller müssen in der Art der Methode liegen. Wir haben eine Reihe von Untersuchungen bei verschiedenen Infektionskrankheiten angestellt, die unsere Vermutung, daß die verschiedenen Befunde in der Methodik liegen, bestätigen.

Der Schwerpunkt der Frage der Spezifität liegt in der Ausführung der Wassermannschen Reaktion, d. h. in der Art der Methodik. Wassermann hebt mit besonderem Nachdruck hervor, daß seine Originalmethode gegenüber allen Abänderungsvorschlägen den Vorzug habe, nur sichere Lues anzuzeigen. Wie wir bereits ausgeführt haben, trifft dies für alle Untersuchungen zu, bei denen ein Überschuß an Alexin vorhanden ist. Im gewöhnlichen Betriebe jedoch wird es, wie wir nachweisen konnten, nicht selten zur Verwendung von Meerschweinchenseren kommen, die entweder durch unzweckmäßige Behandlung oder schlechte Gewinnung eine sehr geringe komplettierende Kraft besitzen, und sodann in der gewöhnlichen Gebrauchsmenge von 0,5 ccm weder allein und schon gar nicht mit Extrakt und Patientenserum zusammen imstande sind, komplette Hämolyse herbeizuführen. Die Originalmethode verbürgt daher die Spezifität einer positiven Reaktion nicht sicher.

Die bisherigen Abänderungsvorschläge zur Ausführung der Wassermannschen Reaktion haben allerdings die Grenze der Spezifität vielfach noch viel mehr überschritten. So hat Meirowsky[1]) die Resultate vergleichender Versuche nach der Frankfurter und Breslauer Methode mitgeteilt: Die Unterschiede beider Methoden liegen in der Verdoppelung der Patientenserummenge und in der Halbierung der gewöhnlichen Aktivserummenge nach der Breslauer Methode. Der Prozentsatz der negativen Reaktionen war nach der Breslauer Methode bei sekundärer und namentlich bei tertiärer Syphilis viel kleiner als bei der Frankfurter Methode. In Frankfurt wird eben mit einem Überschuß von lösenden Faktoren gearbeitet, der zwar keine paradoxen Befunde aufkommen läßt, aber auch zahlreiche Sera mit geringem Gehalt an syphilitischen Stoffen der Diagnose entzieht. Die Breslauer Methode läßt wieder, wie Meirowsky sagt, die hemmenden Faktoren im Versuch mehr hervortreten, führt jedoch dadurch zum Auftreten von paradoxen Befunden. Meirowsky steht auf dem Standpunkt, lieber mit der Existenz von paradoxen Seren zu rechnen, als auf eine große Zahl von positiven Reaktionen zu verzichten. Ähnliche Untersuchungen mit denselben Methoden hat auch Schloßberger[2]) mitgeteilt. Mit der schablonenhaften Verringerung des Meerschweinchenserums um die Hälfte und gleichzeitiger Verdoppelung der Patientenserummenge fand Schloßberger oft in den Extraktkontrollen Hemmungen, zuweilen auch in den Serumkontrollen. Eine einwandfreie Beurteilung ist in vielen Fällen nicht mehr möglich oder bereitet Schwierigkeiten. Ähnliche Wahrnehmungen machten auch Kromeyer und Trinchese bei der Reduktion der Komplementmenge auf die Hälfte. Eine Steigerung der positiven Reaktionen wurde allerdings erzielt, aber gleichzeitig die Gefahr unspezifischer Hemmungen sehr groß. Vielfach wurde bei derartigen Ergebnissen sodann von schwankenden individuellen Eigenschaften des Komplements gesprochen, während die Ursache einfach in der ungenügenden Komplementmenge lag. Auf derart unsicherer Grundlage darf also eine neue Methode nicht aufgebaut sein.

---

1) D. med. W. Nr. 27, 1912.
2) Z. f. I. Bd. XIX, 1913.

Es ist unbedingt notwendig, daß eine neue Methodik auch einer strengen klinischen Prüfung der Befunde unterworfen wird. Bei unseren Vergleichsuntersuchungen mit dem Material der Klinik Zumbusch konnten wir eine weitgehende klinische Überprüfung durchführen. Im ganzen wurden 1292 Sera im Hygienischen Institut nach unserer Methode (und auch nach der Originalmethode) und an der Klinik Zumbusch lediglich nach der Originalmethode genauestens untersucht. Die Reagentien waren insoweit gemeinsam, als ein Teil der Untersuchungen mit hämolytischen Sera der Firma Merck an beiden Stellen untersucht wurde, und ebenso an einigen Untersuchungstagen auch der gleiche Extrakt benützt wurde. Von diesen 1292 Seren wurden nach unserer Methode 363 positiv befunden, nach der Originalmethode an der Klinik jedoch nur 245. Der Unterschied von 118 positiven Seren mehr am Hygienischen Institut ist recht bedeutend und legt die Frage nahe, in welchem Umfange bei diesen positiven Befunden unspezifische Hemmungen eine Rolle spielten. Vorerst muß hervorgehoben werden, daß die Untersuchungssera der Klinik Zumbusch nicht allein von Patienten dieser Klinik selbst, sondern sogar überwiegend aus anderen Abteilungen und Ambulatorien der Poliklinik und aus einer Klinik (Geheimer Rat v. Müller stammen. Diese Herkunft der Sera erklärt, warum nicht jeder einzelne Fall diagnostisch völlig sichergestellt und längere Zeit hindurch beobachtet werden konnte. Bereits die Unterscheidung nach den klinischen Befunden derjenigen Fälle, die sowohl an der Klinik wie im Hygienischen Institut einen positiven Befuud aufwiesen (232 Fälle), läßt dies erkennen. Von diesen auch nach der Originalmethode positiven Fällen hatten zur Zeit der Untersuchung 146, d. i. kaum 63 Proz. die Diagnose Lues, von den restlichen 86 Fällen hatten 49 noch keine klinische Diagnose, 37 eine abweichende Diagnose. Von den 49 Fällen ohne klinische Angabe wurden nachträglich 31 als Lues erkannt; nur 18 blieben als unaufgeklärter Rest. Von den 37 Fällen mit abweichender Diagnose wurden 28 nachträglich als Lues erkannt und blieben nur 9 mit anderer Diagnose bestehen. Von der Gesamtzahl beiderseits positiver Befunde (232) blieben daher 27 Fälle entweder ohne klinische Angabe

oder mit nichtluetischer Diagnose zurück, also 11,6 Proz. Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß von diesen 27 Fällen, die selbst nach der Originalmethode ein positives Resultat ergeben hatten, bei genauerer Nachforschung wohl fast alle ebenfalls irgendeine Form von Lues ergeben hätten. Dieses Ergebnis muß die Grundlage für die Beurteilung derjenigen Fälle bilden, die nur nach unserer Methode ein positives Resultat zeigten, nach der Originalmethode jedoch ein negatives. Es handelt sich um 107 Fälle. Von diesen 107 Fällen ergab bereits die erste klinische Diagnose 63 Fälle von Lues verschiedener Art; bei 28 Fällen wurde nachträglich auch klinisch Lues festgestellt. 1 Fall scheidet ohne anamnestische Angabe durch Tod aus, je 1 Fall ergab nach einer nochmaligen Untersuchung auch nach der Originalmethode positiven bzw. zweifelhaften Befund, 1 weiterer Fall hatte kurz vor dieser Untersuchung mit der Originalmethode einen positiven Befund gegeben. Die Summe der Luesfälle beträgt daher 95, d. i. rund 90 Proz. Es handelt sich überwiegend um Lues latens, um allgemeine Lues und Gefäßlues, weniger häufig um Lues I und II und Tabes dorsalis. Von diesen Krankheitsformen der Lues ist im allgemeinen bekannt, daß sie meist schwächere positive Reaktionen ergeben. 12 Fälle blieben unaufgeklärt übrig, von denen jedoch 7 keine klinische Diagnose erhielten. Der Grund liegt in der Art des vorliegenden Materials. Nur 5, d. i. 4,7 Proz. von den nach unserer Methode positiven 107 Fällen hatten eine nichtluetische Diagnose. Es handelte sich um je 1 Fall von Infiltration der Lungenspitzen, von Nervenleiden, Morbus Basedowi, Rectamcarcinom und Psoriasis. Die Wahrscheinlichkeit ist sehr groß, daß selbst von diesen 5 Fällen der eine oder der andere bei Gelegenheit längerer Nachforschung als Lues erkannt worden wäre. Für Tuberkulose und Karzinom ist es, wie wir früher besprochen haben, nachgewiesen, daß es in schwer konsumptiven Fällen zu unspezifischen Hemmungen kommt. Die klinische Überprüfung hat daher ergeben, daß unsere Methode zum Unterschied von der Originalmethode eine wesentlich größere Zahl von positiven Befunden liefert, die streng spezifischer Natur sind. Unspezifische Hemmungen spielen dabei keine größere Rolle als

bei der Originalmethode. Für den Kliniker hat die größere Empfindlichkeit der Methode einen außerordentlichen Vorzug. Für Fälle von manifester Lues ist die Luesdiagnostik überflüssig, aber gerade für die Fälle von Lues latens und überhaupt von verborgener Lues, die kaum äußere Erscheinungen bieten, soll die Serodiagnostik das Hilfsmittel bilden, um auf die richtige Fährte zu führen.

2. Empfindlichkeit der Methodik.

Wegen der besonderen Schwierigkeiten der Reaktion verlangt Wassermann von seiner Originalmethode nur, daß sie stärkere positive Reaktionen mit völliger Sicherheit erkennen läßt. Diese Milderung der Anforderung an Empfindlichkeit hat jedoch vom klinisch-methodischen Standpunkte nur Berechtigung, wenn wenigstens eine bestimmte Menge spezifischer Stoffe durch die Reaktion stets gleichmäßig nachgewiesen werden kann. Voraussetzung dafür ist, daß bei Verwendung von 0,5 Aktivserum (Verd. 1 : 10) stets ein gleich großer Überschuß von Komplement annähernd erreicht wird. Wir haben bereits ausführlich nachgewiesen, daß dieser Forderung die Originalmethode in keiner Weise entspricht, da der reine Komplementtiter und auch der Gebrauchstiter mit Einrechnung der Extrakt- und Serumhemmung schwankende Größen sind und das Verhältnis dieser Summe zu dem gleichbleibenden Komplementüberschuß verschieden werden muß. Bei dieser Sachlage muß es daher bei der Anwendung der Originalmethode zu einem stark wechselnden Ausfall der Reaktion, bedingt durch den Wechsel der Empfindlichkeit, kommen. Bei unseren vergleichenden Untersuchungen mit der Originalmethode kamen Versuchsergebnisse vor, die den Kliniker in helle Verzweiflung setzten. Aus unseren Versuchsreihen möchten wir 2 Beispiele hervorheben. An einem Tage wurden 30 Sera untersucht, von denen nach der Originalmethode an der Klinik nur 5 positiv waren, Fälle die eigentlich klinisch keiner Bestätigung bedurft hätten; und doch waren unter diesen 30 Seren eine Reihe von Fällen, die klinisch Unsicherheiten boten. Nach unserer Methode wurden von diesen 30 Seren 14 positiv befunden, und

hiebei außer den stark positiven 5 Fällen 6 weitere Fälle mit sicherer, wenn auch schwächerer positiver Reaktion, die den Kliniker weitaus mehr interessierten. Bei 2 Fällen war Lues wahrscheinlich, in 3 Fällen lautete die klinische Diagnose auf Lues latens und in 1 Fall auf beginnende Tabes. Gerade diese Fälle bedurften der serologischen Bestätigung. An einem andern Versuchstage wurden 54 Sera untersucht. An der Klinik wurden nach der Originalmethode 7 positive Resultate gefunden, nach unserer Methode 15; und unter den 8 nach der Originalmethode negativen Fällen waren 3 Fälle von Lues latens, 2 Fälle von wahrscheinlicher Lues und wieder 1 Fall von Tabes; durchweg Fälle, die gerade dringend einer Bestätigung durch die Seroreaktion verlangten, um eine spezifische Therapie einleiten zu können. Ähnliche Beispiele könnten wir in Fülle anführen.

Eine ganz besondere Befriedigung gewährt es, mit unserer Methode die einzelnen Krankheitsfälle längere Zeit zu verfolgen. Im allgemeinen war das Bestreben vorhanden, die nur nach unserer Methode positiven oder zweifelhaften Fälle nochmals zur Untersuchung zu bringen. Von 14 Fällen, die bei der ersten Untersuchung nur bei uns ein positives Resultat ergeben hatten, wurden bei der zweiten Untersuchung nach unserer Methode 9 als positiv bestätigt, 4 hatten jetzt nur mehr einen zweifelhaften Befund und 1 Fall (alte Lues) ein negatives Resultat. Auch nach der Originalmethode hatten bei der zweiten Untersuchung an der Klinik von diesen 14 Fällen 4 positiven und 3 zweifelhaften Befund. Auch ein Beweis, daß bereits bei der ersten Untersuchung spezifische Stoffe vorhanden waren. Umgekehrt zeigte sich bei 2 Fällen, die nach der ersten Untersuchung bei uns negativ, an der Klinik jedoch mit der Originalmethode positiv waren, bei der zweiten Untersuchung auf beiden Seiten ein negatives Resultat. Hier lagen daher für die Klinik unspezifische Befunde vor. Von klinischer Seite wird auf diese Bedeutung der Methodik nach diesen Richtungen noch näher eingegangen werden. Namentlich zur Beurteilung des Einflusses einer spezifischen Therapie auf das Vorhandensein spezifischer Stoffe in den Körpersäften ist eine empfindliche und doch zuverlässige Methode von größtem Wert.

Ein bestimmter Wandel in der Auffassung ist auch eingetreten in der Frage der Verwertung zweifelhafter Resultate. Wassermann, Maier und andere verlangten, daß nur eine totale Hemmung der Hämolyse als positive Reaktion gerechnet werden dürfe. In der Praxis wird dieser Forderung im Sinne Wassermanns dahin entsprochen, daß bei Erstuntersuchungen nur eine totale oder fast komplette Hemmung als positives Resultat gewertet wird. Schwächere Hemmungen jedoch, wie z. B. *dH* (deutliche) oder *sH* (schwache Hemmung) gelten als zweifelhaftes Ergebnis und sollen Anlaß für eine zweite Untersuchung geben. Nur bei klinisch sicherer Lues wird ein zweifelhaftes Ergebnis, das eigentlich ein schwach positives Resultat darstellt, auch als solches verwertet. Wir sind bei den Untersuchungen in Teschen zunächst mit der Bewertung der Resultate nicht völlig so streng gewesen, sondern haben auch sicher schwach positive Befunde (aber nur *dH* = deutliche Kuppe) bei Lösung aller Kontrollen als ein solches aufgefaßt. Bei den Untersuchungen in München haben wir uns streng an die Wassermannsche Vorschrift gehalten. Der Unterschied in den Resultaten ist durch diese Verschiedenheit der Auffassung nur unwesentlich verringert worden, während man annehmen könnte, daß bei einer empfindlichen Reaktion wie der unsrigen, der Prozentsatz der zweifelhaften Befunde wesentlich größer sein müsse als bei der Originalmethode. Bei den Untersuchungen in München hatten wir z. B. mit dem Material der Klinik Zumbusch (1292 Sera) 41 zweifelhafte Ergebnisse, d. i. 3,1 Proz.; an der Klinik selbst nach der Originalmethode 32, d. i. 2,5 Proz. Der Unterschied ist daher sehr gering.

Ein wesentlich verschiedenes Ergebnis hatten die Vergleichsuntersuchungen mit Seren aus der Militärärztlichen Akademie in München: Nach unserer Methode ergaben sich bei 524 Seren 22 zweifelhafte Resultate, d. i. 4,1 Proz., an der Akademie jedoch nach der Originalmethode 55 zweifelhafte Resultate, d. i. 10,4 Proz. Dieser Unterschied ist sehr auffallend. Die Aufklärung ist darin gelegen, daß an der Akademie häufig das Meerschweinserum geringe Wirkung zeigte und es dadurch abnorm häufig zu zweifelhaften Resultaten und unspezifischen Hemmungen kam, während

bei unserer Methode mit Berücksichtigung des jeweiligen Alexintiters nur wirklich schwach positive Befunde als solche gefunden wurden. Noch viel deutlicher tritt dies in die Erscheinung, wenn wir die vergleichenden Untersuchungen mit der Originalmethode am Institut und an der Akademie betrachten: Unter 411 Seren dieser Art hatte das Hygienische Institut nur 2 zweifelhafte Resultate, d. i. 0,4 Proz., die Akademie jedoch 32, d. i. 7,7 Proz. Hierin muß eine große Zahl völlig unspezifischer schwächerer Hemmungen enthalten sein.

Eine zuverlässige Methode muß auch in den Händen verschiedener Untersucher übereinstimmende Resultate ergeben. Wassermann hat auf diese technische Übereinstimmung gerade in seiner letzten Veröffentlichung einen besonderen Wert gelegt. Für unsere neue Methode suchten wir diese Beweisführung dadurch zu erbringen, daß die Sera, die an der Klinik Zumbusch für einen Versuchstag einliefen, jedes einzelne in 2 Teile geteilt wurden, und der eine Teil an der Klinik, der andere Teil im Hygienischen Institut, aber beiderseits nach unserer Methode, ohne irgendwelche Gleichheit der Reagentien, wie Extrakte, Immunsera und Aktivsera, untersucht wurde. Die Resultate wurden sowohl an der Klinik wie am Institut verzeichnet und erst am nächsten Tage nach Abschluß der Ergebnisse miteinander verglichen. Das Ergebnis war folgendes: Von 311 Seren wurden im Hygienischen Institut 51, d. i. 16,4 Proz. positiv, 45, d. i. 14,5 Proz. zweifelhaft und 215, d. i. 69,1 Proz. negativ befunden; an der Klinik hingegen positiv 53, d. i. 17 Proz., zweifelhaft 46, d. i. 14,8 Proz. und negativ 212, d. i. 68,2 Proz. Die größere Zahl der zweifelhaften Ergebnisse bei diesen 311 Resultaten ist auf Sera mit stärkerer Eigenhemmung zurückzuführen. Der Unterschied in der Zahl der positiven Ergebnisse beträgt also 2, jener der zweifelhaften 1 und der negativen 3 Fälle. Die unterschiedlichen positiven Befunde betrafen 1 Fall von alter Lues, der im Hygienischen Institut ein negatives, an der Klinik jedoch ein schwach positives Resultat ergab. Weitere 5 Fälle zeigten nur graduelle Unterschiede zwischen einem zweifelhaften, d. h. einem schwach positiven Ergebnis und einer kompletten oder fast kompletten Hemmung der Hämolyse. Von

diesen 5 Fällen waren 3 im Hygienischen Institut in diesem Sinne zweifelhaft, an der Klinik jedoch positiv, 2 andere Fälle hinwieder im Institut positiv und an der Klinik zweifelhaft. Den Unterschied ergab eben der 2. Fall, der im Summarium in die Erscheinung tritt. Diese 5 zweifelhaft-positiven Fälle betrafen 3 Patienten von klinischer Lues, 1 Fall hatte die Diagnose Lungentuberkulose und der 5. Fall war ohne Diagnose. Nach diesem Ergebnis kann man an der guten technischen Übereinstimmung der Untersuchung derselben Sera an verschiedenen Stellen nach unserer Methode nicht zweifeln. Die Resultate sind ebensogut wie bei der Wassermannschen Vergleichsreihe von 50 Seren, bei denen jedoch auch eine weitgehende Gleichheit der Reagentien (auch Aktivserum) innegehalten wurde.

In diesem Rahmen muß auch die Frage nach dem Vorkommen von paradoxen Reaktionen, d. h. von einem verschiedenen Ausfall der Reaktion bei nachfolgender Untersuchung desselben Serums besprochen werden. Auf diese Erscheinung machte zuerst M. Stern[1]) aufmerksam. M. Stern führte den wechselnden Reaktionsausfall auf individuelle Verschiedenheiten des Meerschweinchenkomplements zurück und glaubte einer Komplementoidbildung des Meerschweinchenserums die Schuld geben zu müssen. Im allgemeinen fand Stern, daß bei vielen Hundert Vergleichsseren 92 Proz. auch bei der zweiten und dritten Untersuchung konstant positiv blieb, bei 8 Proz. zeigten die Sera schwächere Hemmungen oder sogar negative Resultate. Andere Angaben dieser Art machte Meirowsky[2]). Meirowsky fand auch vielfach positive Sera bei der zweiten Untersuchung negativ und negative Sera wieder positiv und zwar sowohl bei der Anwendung der Originalmethode wie auch bei den Modifikationen von Stern, Bauer und Hecht. Eine Erklärung suchte Meirowsky darin, daß der Ausfall der Reaktion bei Seren mit geringem Gehalt an Reaktionskörpern nicht nur von diesem geringen Gehalt abhängig ist, sondern auch von dem jeweiligen Zustand der zur Einstellung der Reaktion verwendeten Faktoren. „Ob man also

1) Z. f. I. Bd. V, H. 2 u. 3, 1910.
2) D. med. W. Nr. XXVII, 1912.

bei denselben Serum eine positive oder negative Reaktion bekommt, ist von Imponderabilien abhängig.“

Auch Rasp und Sonntag[1]) studierten die Frage der paradoxen Sera. Sie fanden jedoch nur Schwankungen zwischen negativen und inkompletten positiven Ausfällen bei etwa 6 Proz. der Sera. Die Auslegung der Paradoxie der Reaktion war bisher sehr verschiedenartig. Gelegentlich einer Diskussion auf der Dermatologen-Tagung in Frankfurt a. M. ist von Sachs, Höhne, Hoffmann und anderen behauptet worden, daß es überhaupt keine paradoxe Sera gäbe, und daß überall, wo sie zur Beobachtung kommen, die Technik des Untersuchers verantwortlich gemacht werden müßte. M. Stern sieht den Grund der Paradoxie in der Variabilität der bei der Wassermannschen Reaktion verwendeten Faktoren, namentlich des Meerschweinchenserums. Auch Rasp und Sonntag erblicken die Ursachen einerseits in der wechselnden Ablenkbarkeit des Komplements und anderseits in physikalisch-chemischen Vorgängen und Umsetzungen in den Seren selbst. Die Beobachtungen mit unserer Methodik müssen diesen letzteren Gründen im wesentlichen recht geben. Unsere Ausführungen über die außerordentlich verschiedene Wirksamkeit des Aktivserums lassen erkennen, daß alle Methoden, bei denen nicht das Aktivserum für jede Versuchsreihe titriert wird — auch in der Voraussetzung, daß der Gehalt an Reaktionsstoffen in einem Serum Tage hindurch der gleiche bleibt —, von Untersuchungstag zu Untersuchungstag schwankende Resultate ergeben müssen. Eine empfindliche Methode wie die unsrige führt zwar auch hie und da zu kleinen graduellen Unterschieden, aber sie verhindert grobe Unstimmigkeiten und Schwankungen von einem stark positiven Befund an einem Tag zu einem negativen Resultat am nächsten Tag bei dem gleichen Serum, wie sie bei der Originalmethode vorkommen müssen. Anderseits haben wir wiederholt wahrnehmen können, daß ungeachtet kleiner gradueller Unterschiede doch auch nach der Annahme von Rasp und Sonntag ein Abbau oder eine allmähliche Zersetzung der spezifischen Stoffe in Luesseren erfolgen müsse. Oft ergeben schwache positive Sera

1) Arch. f. Hyg. Bd. 79, 1913.

am nächsten Tag oder einige Tage später noch genau dasselbe Resultat. Wiederholt jedoch war an den nächsten Tagen nur noch zweifelhafter Befund vorhanden, oder es konnte überhaupt keine Hemmung der Hämolyse mehr bemerkt werden. Bei stark positiven Seren konnten wir eine derartige Reaktionsveränderung niemals wahrnehmen. Nach unserer Auffassung ist es daher richtig, daß für die Beurteilung der Paradoxie der Reaktion und der Häufigkeit einer derartigen Erscheinung die Art der Methodik von maßgebendem Einfluß ist. Unsere Methode ermöglicht auch nach dieser Richtung ein genaues und sicheres Verfolgen dieser Erscheinung.

Auf das Vorkommen der Wassermannschen Reaktion in den verschiedenen Stadien der Syphilis gehen wir nicht ein. Die allgemeine Einführung einer genügend und gleichmäßig empfindlichen Methodik könnte manchen Unterschied über das Vorkommen positiver Befunde in den verschiedenen Stadien klären. Für die Behandlung und den Heileffekt wäre besonders wichtig eine Unterstützung durch die Serodiagnostik bei der Initialsklerose und bei allen latenten Formen der Lues. Von dem rechtzeitigen Einsetzen einer spezifischen Behandlung hängt bei dieser so stark verbreiteten Volkskrankheit sehr viel ab. Die Wahrnehmung, daß gerade für die latente Lues überaus schwankende Angaben hinsichtlich des Nachweises spezifischer Stoffe in den Körpersäften vorliegen, ist ebenfalls ein Beweis, daß die gewöhnlich gehandhabte Originalmethode nach dieser Richtung offenbar unzuverlässig ist. So schwankt z. B. der Prozentsatz der positiven Fälle bei der Frühlatenz nach Literaturangaben zwischen 12 bis 80 Proz., bei der Spätlatenz zwischen 11 bis 79 Proz. Eine zuverlässige Methodik wird aber namentlich auch den Einfluß der Behandlung genau verfolgen lassen. Die meisten Autoren, wie Blaschko, Citron, Lesser, Neisser u. a. betrachten eine positive Reaktion als ein Symptom aktiver Syphilis, ebenso wie Pappeln und Flecke Symptome von Syphilis von seiten der Schleimhäute und der Haut sind. Das Vorhandensein spezifischer Stoffe in den Körpersäften gibt daher auch an, wie lange eine Behandlung fortgeführt werden soll und das Neuauftreten dieser

Stoffe wieder, wann eine nochmalige Behandlung wieder einsetzen muß. Die Einwände von Fischer, Kopp, Much u. a. daß eine positive Wassermannsche Reaktion nur zeige, daß der Patient überhaupt Syphilitiker sei, sind vorwiegend durch die bisherige unzuverlässige Methodik entstanden. In der Praxis jedoch wird im allgemeinen festgehalten, daß man die positive Reaktion zum Schwinden bringen und die Neubehandlung einleiten müsse, sobald wieder spezifische Stoffe nachgewiesen werden können. Daraus ergibt sich die weitere Notwendigkeit, die einzelnen Luetiker klinisch und serodiagnostisch etwa jeden Monat zu untersuchen. Allerdings gibt es Perioden klinischer Latenz und negativer Reaktion, die eine scheinbare Heilung für längere Zeit vortäuschen können. Aus all dem ergibt sich mit Bestimmtheit, daß von allen syphilitischen Symptomen die positive Wassermannsche Reaktion das konstanteste Merkmal ist und als Anlaß zu einer spezifischen Behandlung benützt werden muß. Diese Erfahrungstatsache und die außerordentliche Verbreitung der Syphilis als Volkskrankheit sichern der Serodiagnostik eine hohe Bedeutung, die von Jahr zu Jahr zunimmt. Bekanntlich ist die Syphilis nach der Tuberkulose die verbreitetste Volkskrankheit. In der Wirkung auf die Deszendenz ist sie das unheilvollste Leiden.

Die zunehmende Bedeutung der Reaktion bekundet sich auch durch die Heranziehung derselben für die forensische Medizin, bei Prostituierten- und Ammenuntersuchungen, beim Ehekonsens und insbesonders auch bei den in den letzten Jahren angestellten Massenuntersuchungen. So hat Hubert[1]) in den Jahren 1912 bis 1915 in München 8652 Krankenhauspatienten mit Hilfe der Wassermannschen Reaktion untersucht, von denen 759, d. s. 8,8 Proz. luetisch waren oder an den Folgen der Lues litten; von den Männern 8,5 Proz., von den Frauen 9 Proz. Bei den letzteren wurde auffallend häufig latentverlaufene Lues beobachtet. Bei 52 Proz. der Männer und bei 75 Proz. der Frauen ergaben sich keine anamnestischen Anhaltspunkte für Lues. Ausdrücklich muß bemerkt werden, daß keine Auswahl des Krankenmaterials stattgefunden hatte. Die Patienten waren wegen der verschie-

1) M. med. W. Nr. 39, 1915.

densten körperlichen Beschwerden in das Krankenhaus gekommen. Gerade bei der latenten Lues, die ein Drittel aller positiven Fälle ausmachte, spielt also die Wassermannsche Reaktion eine überaus wichtige Rolle für die Erkennung des Leidens. Wenn auch nicht anzunehmen ist, daß der Prozentsatz der Luetiker in der Gesamtbevölkerung ein gleich hoher ist, so kann doch etwa ein Prozentsatz von 2 bis 3 Proz. angenommen werden. Es wäre hoch an der Zeit, durch Massenuntersuchungen nach Wassermann einwandfreie Belege für die Verbreitung der Lues zu gewinnen. Bisher ist noch keine einheitliche Organisation der Luesbehandlung vorhanden, namentlich nicht auf dem Lande. In stark durchseuchten Gegenden, wie z. B. in Ostgalizien und in der Bukowina, wurden staatliche Einzelaktionen durchgeführt, aber ohne bestimmtes System. Die immer stärkere Erfassung der erwerbstätigen Bevölkerung in der Kranken- und Invalidenversicherung führt allmählich zur sachgemäßen Behandlung, aber von der ärztlichen Kontrolle aller Luetiker auf aktive Lues mit Hilfe des Blutbefundes sind wir noch weit entfernt. Der Weltkrieg hat nach dieser Richtung neue Anregung gebracht. Es soll hier nicht erörtert werden, ob durch die Kriegsverhältnisse eine besonders starke Vermehrung luetischer Erkrankungen eingetreten ist oder nicht. Sicher sind die Befürchtungen, die man zu Kriegsbeginn auf Grund der Erfahrungen in früheren Kriegen gehegt hat, teilweise übertrieben gewesen. Dem Sachkenner fällt bei kritischer Betrachtung der Entwicklung der Geschlechtskrankheiten bei der Armee im Felde auf, wie groß mit dem Fortschreiten der Organisation des serodiagnostischen Untersuchungsdienstes der Prozentsatz der Rezidiven wird und zwar nicht nur nach Neuerkrankungen im Verlaufe des Krieges, sondern auch bei alten Luesfällen. Gerade diese letzteren Fälle wären im Frieden nur zum geringen Teil einer Behandlung zugeführt worden. Jetzt ist für die großen Massen des Volksheeres der Behandlungszwang selbstverständlich und hiedurch ist auch die Möglichkeit geboten, die Heilung und Kontrolle in einem Umfange durchzuführen, wie dies früher nicht gegeben war. Je straffer dieser serodiagnostische Untersuchungsdienst gehandhabt wird, desto mehr wird die Arbeit

bei der Abrüstung erleichtert. Für die Luetiker muß die Generaluntersuchung bei der Entlassung aus dem Heeresdienste, die Nachbehandlung bei positiver Reaktion und namentlich die Organisation eines dauernden umfassenden Untersuchungs- und Untersuchungskontrolldienstes im Rahmen der Krankenversicherung in Stadt und Land angestrebt werden. Die Hauptaufgabe — eine Ermittlung aller Luetiker und gegenseitige Benachrichtigung aller in Betracht kommenden Behörden — wurde bereits durch eine neue Listenführung gelöst. Bereits sind im ganzen Deutschen Reiche über 100 Beratungsanstalten für Geschlechtskranke von den Landesversicherungsanstalten eingerichtet worden, die auch die serologische Untersuchung der Syphilitiker ausführen oder vermitteln. Für diesen Untersuchungsdienst, der in Zukunft eine so außerordentlich große Bedeutung gewinnen wird, ist jedoch eine gesicherte und verlässige Methodik Voraussetzung.

Wie wir ausgeführt haben, sind die Praktiker mit der Wassermannschen Reaktion in der Ausführung nach der Originalmethode nicht zufrieden. Von klinischer Seite und zwar von Saalfeld[1]) wurde neuerdings wieder die Forderung erhoben, daß es namentlich in Anbetracht des Anschwellens serodiagnostischer Untersuchungen für die Heeresangehörigen dringendst notwendig sei, die praktische Handhabung der Serodiagnostik der Syphilis einheitlich zu regeln. Schon früher haben M. Stern[1]) und auch Graetz[2]) verlangt, daß die ganze Vergleichstechnik für die Wassermannsche Reaktion auf eine einheitliche Basis zu stellen sei. Dem Vernehmen nach steht auch der Reichsgesundheitsrat auf dem Standpunkt, daß die Herausgabe einer Anweisung für die Ausführung der Wassermannschen Reaktion nicht mehr zu umgehen sei. Während des Weltkrieges wurde in diesem Sinne bereits vorgegangen. Der Chef des deutschen Feldsanitätswesens hat bereits Ende März 1916 für die Ausführung und Beurteilung der Wassermannschen Reaktion bestimmte Richtlinien angegeben, in denen die Anwendung der Wassermannschen Originalmethode den Heeresuntersuchungsstellen obligatorisch vor-

1) l. c.
2) D. med. W. Bd. 56, 1913.

geschrieben wurde. Anderseits hat man die militärischen Untersuchungsstellen auch verpflichtet, spezifische Extrakte und hämolytische Antisera ausschließlich von dem unter Leitung von Wassermann stehenden Kaiser-Wilhelms-Institut für experimentelle Therapie, bzw. von der Kaiser-Wilhelms-Akademie in Berlin zu beziehen. Unsere Vergleichsuntersuchungen dürften für die Beurteilung und Einschätzung der Originalmethode einige neue Gesichtspunkte gebracht haben. Eine Anweisung für die Durchführung der Reaktion kann nur eine Methodik empfehlen, die nach strenger wissenschaftlicher Prüfung hinreichende Empfindlichkeit gibt und übereinstimmende Befunde gewährleistet. Der Nachdruck ist nicht auf die Herausgabe staatlich geprüfter Agentien zu legen, sondern vielmehr auf die Zuverlässigkeit der Methodik.

Zusammenfassung für den Abschnitt III.

1. Von einer serodiagnostischen Methode zur Feststellung spezifischer Stoffe in den Körpersäften mit Lues infizierter Personen muß verlangt werden: weitgehende Spezifität, hinreichende Empfindlichkeit (Schärfe) und eo ipso Übereinstimmung der Resultate verschiedener Untersucher.

2. Die Originalmethode gibt der Wassermannschen Reaktion infolge des wechselnden Wirkungswertes des Aktivserums eine wechselnde Empfindlichkeit, die einen Ausfall bis zu 50 Proz. klinisch sicherer Luesfälle bewirken und anderseits wieder zu unspezifischen Hemmungen Veranlassung geben kann.

3. Übereinstimmende Resultate lassen sich mit ihr bei Untersuchungen an verschiedenen Orten selbst bei Verwendung staatlich geprüfter hämolytischer Sera und Extrakte gewöhnlich nicht erzielen.

4. Nur bei Verwendung des gleichen Aktivserums (zufällige Gleichheit wäre ein Ausnahmsfall) gelingt auch an verschiedenen Untersuchungsstellen mit der Originalmethode gute Übereinstimmung der Resultate.

5. Die Originalmethode genügt daher den unter 1) gestellten Anforderungen nicht, sie ist klinisch und technisch unzuverlässig.

6. Die bisherigen quantitativen Methoden für die Ausführung der Wassermannschen Reaktion mit Abstufung der Serum- (Boas) oder Extraktmenge (Sormani) bewirken infolge Störung der notwendigen Konstanz des Verhältnisses von Extrakt- und Serummengen Über- oder Unterschätzungen des tatsächlichen Gehaltes an spezifischen Stoffen (Luesreagine).

7. Die Methoden mit nicht erhitztem Patientenserum (Aktivserum) lassen einen geringen Gehalt an spezifischen Stoffen infolge wechselnder Stärke des Eigenalexins (Eigenkomplements) seltener erkennen, während die stärkere Reaktion bei stark positiven Seren keinen Vorteil bietet.

8. Die Methode von Müller-Landsteiner mit Aktivserum gibt durch Verwendung unnötig hoher Extraktmengen überdies zur Entstehung unspezifischer Hemmungen Anlaß. Die Verwendung eines alkoholarmen und verdünnten Normalorganextraktes (*N*-Extrakt) verhindert nur einen Teil der unspezifischen oder inkompletten Hemmungen.

9. Die Verstärkung der Reaktion durch Zusatz von Cholesterin (Frankfurter Methode) ist lediglich durch Erhöhung der Hämolyse hemmenden Faktoren bewirkt und gibt leicht Anlaß zu unspezifischen Hemmungen.

10. Unsere quantitative Methode beruht auf der erkannten Gesetzmäßigkeit in der Wirkung zwischen hämolytischem Antiserum und Aktivserum, auf genauer Kenntnis der Wirksamkeit der Extrakte und der Patientensera; sie läßt durch die Art der Anordnung die Gefahren unspezifischer Hemmungen vermeiden.

11. Diese Ergebnisse wurden durch mannigfache vergleichende Untersuchungen mit der Originalmethode und mit anderen Methoden, sowie durch klinische Überprüfung sichergestellt.

12. Die Herausgabe staatlich geprüfter Extrakte und hämolytischer Sera ist wünschenswert, tritt jedoch gegenüber der Auswahl der richtigen Methode in den Hintergrund.
